

**Einfluss von Nukleotiden auf  
die biologische Aktivität von  
Cryptochrom 1 aus *Arabidopsis thaliana***

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer.nat.)

des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg

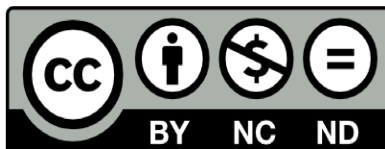
Vorgelegt von

**Christian Orth**

Aus Schwalmstadt/Ziegenhain

Marburg, 2021

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Keine Bearbeitungen  
4.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/de/>



Die vorliegende Dissertation wurde von April 2009 bis Juli 2016 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Alfred Batschauer angefertigt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Orth, C., Niemann, N., Hennig, L., Essen, L.O., and Batschauer, A.** (2017). Hyperactivity of the Arabidopsis cryptochrome (cry1) L407F mutant is caused by a structural alteration close to the cry1 ATP-binding site. J. Biol. Chem. **292**: 12906–12920.

Sonstige Publikationen & Co-Autorenschaften:

**Herbel, V., Orth, C., Wenzel, R., Ahmad, M., Bittl, R., & Batschauer, A.** (2013). Lifetimes of Arabidopsis cryptochrome signaling states in vivo. The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology, **74**(4), 583–592

**Weidler G, Zur Oven-Krockhaus S, Heunemann M, Orth C, Schleifenbaum F, Harter K, Hoecker U, Batschauer A.** (2012). Degradation of Arabidopsis CRY2 is regulated by SPA proteins and phytochrome A. Plant Cell, **24**(6), 2610-23

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg  
(Hochschulkennziffer 1180) als Dissertation angenommen am \_\_\_\_\_

Erstgutachter(in): Prof. Dr. Alfred Batschauer

Zweitgutachter(in): Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der Disputation: \_\_\_\_\_

*„In the fury of the moment  
I can see the Master's hand  
In every leaf that trembles,  
in every grain of sand“*

*(Bob Dylan)*

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	v
Abkürzungen der proteinogenen Aminosäuren .....	vi
Summary .....	vii
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Lichtperzeption in höheren Pflanzen .....	1
1.2 Phytochrome .....	3
1.3 UV-B Rezeptor UVR8.....	5
1.4 UV-A und Blaulicht-Photorezeptoren .....	5
1.4.1 LOV-Sensor Proteinfamilie .....	5
Photozyklus der LOV-Domäne.....	6
1.4.2 Phototropine.....	8
Aktivierung und Signalweiterleitung.....	9
1.4.3 Zeitlupe-Familie.....	10
Signaltransduktion und Signalkomponenten .....	10
1.4.4 Die Photolyase/Cryptochrom-Proteinfamilie.....	11
Evolution der Photolyase/Cryptochrom-Familie .....	12
Strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten .....	14
1.4.4.1 Photolyasen.....	17
1.4.4.2 cryDASH-Proteinfamilie .....	19
1.4.4.3 Cryptochrome .....	20
Cryptochrome in tierischen Organismen.....	20
Funktion als Komponenten der circadianen Uhr .....	20
Magnetoperzeption durch Cryptochrome.....	22
Pflanzliche Cryptochrome .....	23
Expression und Lokalisation .....	23
Struktureller Aufbau .....	24
Aktivierung, Photoreduktion, Oligumerisierung und Photozyklus .....	26
Signaltransduktion und biologische Funktion von Cryptochrom 1 .....	31
ATP-Bindung von Cryptochromen .....	34
Verwendete Mutanten der PHR-Domäne .....	36

<i>cry</i> IIA407F Mutante .....	36
<i>cry</i> IIA402A Mutante .....	37
<b>2 Material</b> .....	39
2.1 Chemikalien .....	39
2.2 Laborgeräte .....	39
2.3 Puffer und Lösungen .....	40
2.4 Nährmedien .....	42
2.5 Antibiotika .....	43
2.6 Proteaseinhibitoren .....	43
2.7 Antikörper .....	43
2.8 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	44
2.8.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme .....	44
2.8.2 Plasmide .....	44
2.8.3 Oligonukleotide .....	45
2.8.4 DNA-Größenmarker .....	46
2.8.5 Protein-Größenmarker .....	46
<b>3 Methoden</b> .....	47
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	47
3.1.1 Kultivierung und Transformation von <i>E. coli</i> .....	47
3.1.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> auf Festmedium .....	47
3.1.1.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> als Flüssigkultur im analytischen Maßstab .....	47
3.1.1.3 Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	48
3.1.1.4 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	48
3.1.2 Isolation von Nukleinsäuren .....	49
3.1.2.1 Plasmid Minipräparation .....	49
3.1.2.1.1 Alkalische Lyse .....	49
3.1.3 Manipulation von DNA .....	49
3.1.3.1 Durchführung einer Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	49
3.1.3.1.1 Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR .....	52
3.1.3.2 Restriktion von DNA .....	53
3.1.3.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	53
3.1.3.4 Klonierung von DNA-Fragmenten .....	54
3.1.3.5 Ligation von DNA .....	54

3.1.4	Analyse von Nukleinsäuren .....	55
3.1.4.1	Gehaltsbestimmung von DNA .....	55
3.1.4.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA .....	56
3.1.4.3	Sequenzierung .....	57
3.2	Proteinbiochemische Methoden .....	57
3.2.1.1	Proteinexpression zur Proteinaufreinigung .....	57
	Expression der PHR-Domäne (AS 2-509) .....	57
3.2.2	Analytische Proteinextraktion aus <i>E. coli</i> .....	58
3.2.2.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten im analytischen Maßstab .....	59
3.2.2.2	Herstellung von löslichen Proteinextrakten im analytischen Maßstab .....	59
3.2.3	Präparative Proteinextraktion aus <i>E. coli</i> .....	60
3.2.4	Proteingehaltsbestimmung .....	60
3.2.4.1	Gehaltsbestimmung durch Amidoschwarz-Methode .....	60
3.2.5	Durchführung einer analytischen SDS-PAGE nach Lämmli .....	61
3.2.6	Coomassie-Färbung von SDS-PAGE Gelen .....	63
3.2.7	Färbung von SDS-PAGE Gelen mit Colloidalem Coomassie .....	63
3.2.8	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot .....	64
3.2.9	Analyse von SDS-Gelen und Western-Blots .....	65
3.2.9.1	Einscannen von coomassie-gefärbten SDS-Gelen .....	65
3.2.9.2	Einscannen von Western-Blot Membranen .....	66
3.2.10	Proteinaufreinigung mit dem Äkta-System .....	66
3.2.10.1	Aufreinigung von Proteinen über Ni-NTA-Affinitätschromatographie .....	67
3.2.10.2	Aufreinigung von Proteinen über SizeExclusion Chromatography (SEC) .....	68
3.2.11	Anreichern und von Proteinlösungen .....	69
3.2.12	UV/Vis-Spektroskopie von Proteinlösungen .....	69
3.2.12.1	Aufnahme der Kinetik der Photoreduktion des FAD-Kofaktors .....	69
3.2.12.2	Auswertung der Photoreduktionskinetiken .....	70
3.2.13	Untersuchungen der Proteinstabilität in Gegenwart von Nukleotiden .....	73
3.2.13.1	Partieller Abbau von Proteinen durch Trypsin .....	73
3.2.13.2	Durchführung von ThermoFAD-Assays .....	74
3.2.14	Luziferase-basierter ATP-Bindungs-Assay .....	75
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>78</b>
4.1	Expression und Aufreinigung .....	78

4.1.1	Expression der cry1 PHR Domänen .....	78
4.1.2	Aufreinigung cry1 PHR Domänen.....	78
4.1.2.1	Ni-NTA Chromatographie .....	78
4.1.2.2	Präparative Gelfiltration.....	81
4.2	UV/Vis Spektroskopie der PHR-Domänen von cry1WT und <i>cry1L407F</i> .....	82
4.2.1	Überprüfung der FAD-Bindung.....	82
4.2.2	Konversion des FAD-Kofaktors durch Belichtung mit Blaulicht und Dunkelreversion.....	83
4.2.3	Kinetiken der FAD-Photokonversion von cry1WT und <i>cry1L407F</i> .....	86
4.2.4	Kinetiken der FAD-Dunkelreversion von cry1WT und <i>cry1L407F</i> .....	90
4.3	Der Einfluss verschiedener Nukleotide auf die Proteinstabilität .....	93
4.3.1	Partielle Trypsinierung.....	93
4.3.1.1	Einfluss von Nukleotiden auf die Trypsin-Sensitivität .....	93
4.3.2	ThermoFAD .....	95
4.3.2.1	Schmelzpunktanalyse.....	95
4.3.2.2	Untersuchung der Basenspezifität.....	97
4.4	Luziferase-basierter ATP-Abreicherungs-Assay .....	98
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>100</b>
5.1	Expression und Aufreinigung .....	100
5.2	Nachweis der FAD-Bindung.....	102
5.3	Vergleich der Photoreduktionskinetiken von cry1WT PHR und <i>cry1L407F</i> PHR..	102
5.4	Einfluss verschiedener Nukleotide auf die Proteinstabilität .....	105
5.4.1	Partielle Trypsinierung der PHR Domäne von Cryptochrom 1 .....	105
5.4.2	Einfluss von Nukleotiden auf die thermische Stabilität von Cryptochrom 1 ....	106
5.4.3	Basenspezifität der Nukleotidbindung von Cryptochrom 1 .....	107
5.5	Stärke der ATP-Bindung von Cryptochrom 1 .....	109
5.6	Abschließende Bemerkungen .....	109
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
	Anhänge .....	130
	Lebenslauf.....	139
	Danksagung .....	140
	Erklärung .....	141

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Ampere	<b>L</b>	Liter
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat	<b>M</b>	mol/L
<b>AMP-</b>	Adenylyl-imidodiphosphat	<b>m</b>	Milli-
<b>PNP</b>			
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat	<b>min</b>	Minute
<b>A.</b>	Bidestilliertes Wasser	<b>MTHF</b>	N <sup>5</sup> N <sup>10</sup> -Methenyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat
<b>bidest</b>			
<b>AS</b>	Aminosäure(n)	<b>NAD</b>	Nicotinamidadenindinukleotid
<b>A.t.</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>NADH</b>	Reduzierte Form von NAD
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>NADP</b>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<b>Bp</b>	Basenpaare	<b>NADPH</b>	Reduzierte Form von NADP
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>phot</b>	Phototropin
<b>cry</b>	Cryptochrom	<b>phy</b>	Phytochrom
<b>CTP</b>	Cytidintriphosphat	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure	<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>DTT</b>	Dithiotreitol	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>s</b>	Sekunde
<b>NTA</b>	<i>Nitriloacetic acid</i>	<b>T<sub>m</sub></b>	Schmelztemperatur
<b>FAD</b>	Flavinadenindinukleotid	<b>T<sub>1/2</sub></b>	Halbwertszeit
<b>FMN</b>	Flavinadeninmononukleotid	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>g</b>	Gramm	<b>V</b>	Volt
<b>GUS</b>	B-Glucuronidase	<b>v/v</b>	Volumen/Volumen
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat	<b>w/v</b>	Gewicht/Volumen
<b>h</b>	Stunde	<b>WT</b>	Wildtyp
<b>kDa</b>	Kilodalton		

**Abkürzungen der proteinogenen Aminosäuren**

<b>Ein-Buchstaben-Code</b>	<b>Drei-Buchstaben-Code</b>	<b>Bezeichnung</b>
<b>A</b>	Ala	Alanin
<b>R</b>	Arg	Arginin
<b>N</b>	Asn	Asparagin
<b>D</b>	Asp	Asparaginsäure
<b>C</b>	Cys	Cystein
<b>Q</b>	Gln	Glutamin
<b>E</b>	Glu	Glutaminsäure
<b>G</b>	Gly	Glycin
<b>H</b>	His	Histidin
<b>I</b>	Ile	Isoleucin
<b>L</b>	Leu	Leucin
<b>K</b>	Lys	Lysin
<b>M</b>	Met	Methionin
<b>F</b>	Phe	Phenylalanin
<b>P</b>	Pro	Prolin
<b>S</b>	Ser	Serin
<b>T</b>	Thr	Threonin
<b>W</b>	Trp	Tryptophan
<b>Y</b>	Tyr	Tyrosin
<b>V</b>	Val	Valin



## Summary

Cryptochromes (cry) are blue light receptors that together with photolyases form the so-called cryptochrome/photolyase family (CPF) with members occurring in all three domains of life. All members of the CPF show high structural similarities within the N-terminal photosensory (PHR, *photolyase homologous region*) domain that non-covalently binds the FAD cofactor. But their biological functions are different. While photolyases are enzymes that repair UV-damaged DNA in a light dependent manner, Cryptochromes lost the ability to repair DNA but gained important functions as photoreceptors to regulate a wide variety of biological responses. The two classical cryptochromes, cry1 and cry2, that are encoded in the model plant *Arabidopsis thaliana* have their main functions as blue-light photoreceptors that regulate photomorphogenesis and photoperiodic flowering.

For the formation of the cryptochrome's active state the photoexcitation of the flavin cofactor and a subsequent electron transfer towards the excited flavin is required. This allows the formation of the photoreceptors active state that, in case of plant cryptochromes, contains the flavin cofactor in its semireduced radical form FADH<sup>•</sup>. The transition from the resting state of the flavin in darkness to the active state is called „photoreduction“.

For cry1 it was demonstrated for the first time in 2003 that plant cryptochromes bind ATP (Bouly et al., 2003). One year later the crystal structure of the PHR domain of *Arabidopsis thaliana* was published. Crystals were soaked with the non-hydrolyzable ATP analogon AMP-PNP and the co-crystal structure showed that the nucleotide is associated within the FAD cavity by a central tyrosine (Brautigam et al., 2004). Since then, not much is known about the nucleotide binding properties of cryptochromes.

In 2010 a mutant of cry1 with a hyperactivity regarding blue-light responses was described (Exner et al., 2010). The mutation was caused by a leucine to phenylalanine exchange at position 407 of the cry1 PHR and was therefore called *cry1L407F* mutant. This mutant showed a *cop*-phenotype in the dark and based on *in-silico* structure modeling it was hypothesized that this mutant might mimic the signal active state of cry1 in darkness and that ATP binding might also be involved in this hyperactivity.

The central aspect of this work was to investigate the effects of the binding of ATP and other nucleotides to the PHR domain of cry1 wild type and *cry1L407F* mutant protein. To have a suitable negative control in the performed assays, an ATP non-binding cry1 mutant was

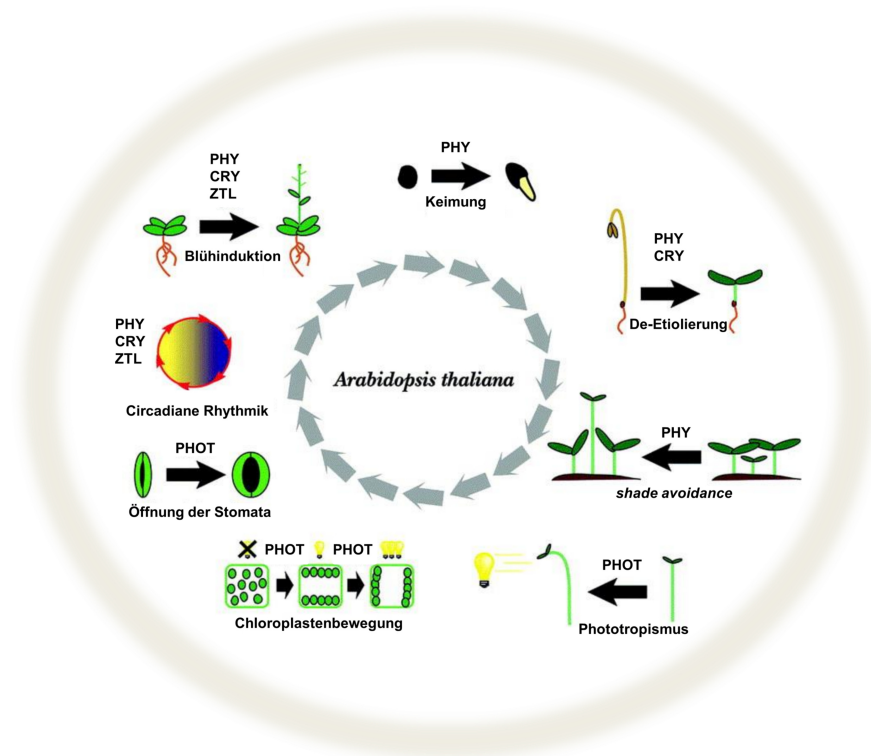
generated by using targeted mutagenesis. In this mutant, called *cry1Y402A*, the tyrosine on position 402, which is essential for ATP-binding in *cry1*, was exchanged to an alanine.

The obtained data demonstrated that ATP enhances the photoreduction of both *cry1*WT and *cry1L407F* by stabilizing the active state of the photoreceptors. In protein stability assays it was shown that ATP binding also increases the stability of *cry1*. The data further indicated that the hyperactivity of the *cry1L407F* mutant is most likely caused by a structural alteration that is different from the structure of *cry1* with ATP bound. Furthermore a luciferase-based ATP-binding assay was established to approach the  $K_D$  of ATP and *cry1*. This provided a basis for later-stage ITC measurements in which a  $K_D$  of 3.3  $\mu$ M was determined for ATP binding to *cry1*. Although many of the aspects of ATP binding of cryptochromes could be addressed the biological function of ATP binding remains unclear.

# 1 Einleitung

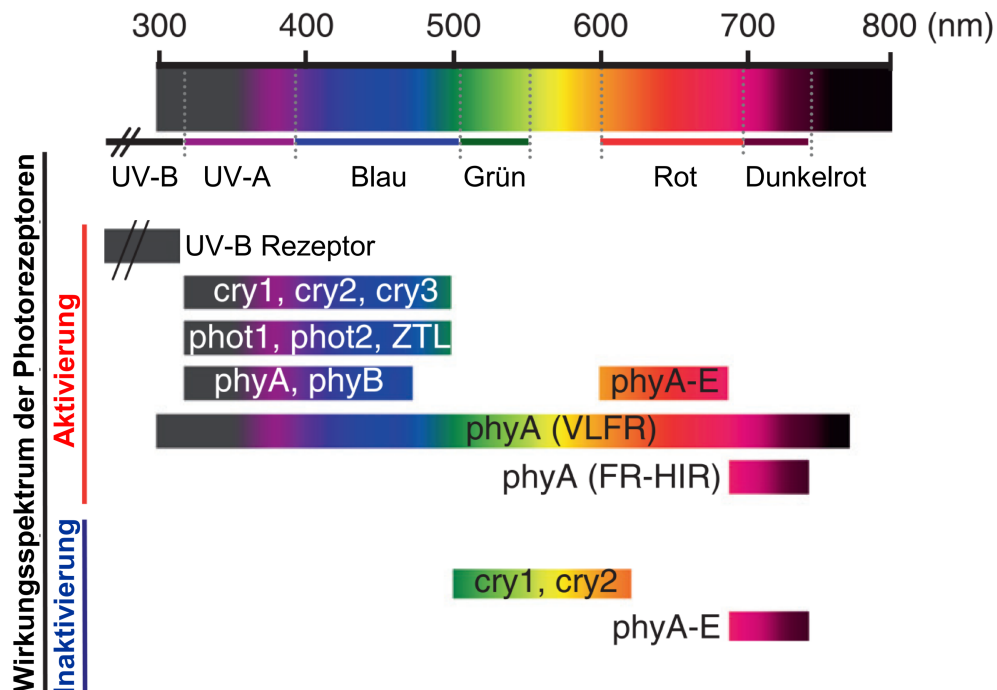
## 1.1 Lichtperzeption in höheren Pflanzen

Licht ist einer der wichtigsten Umweltfaktoren und spielt für alle Organismen eine entscheidende Rolle als Energiequelle- und Signalträger. Besonders Pflanzen müssen als sessile, photoautotrophe Lebewesen in der Lage sein, das einfallende Licht qualitativ und quantitativ wahrzunehmen. Im Verlauf der Evolution haben Pflanzen ein komplexes photosensorisches System entwickelt, durch das sie in der Lage sind, die im Licht enthaltenen Informationen durch Photorezeptoren aufzunehmen, weiterzuleiten und zu verarbeiten. Dies ermöglicht ihnen eine Anpassung an circannuale, diurnale und standortbedingte Veränderungen des Lichtspektrums während ihres gesamten Lebenszyklus (siehe Abb. 1).



**Abb. 1. Photorezeptoren beeinflussen die Entwicklung von *A. thaliana* in allen Entwicklungsstadien.** Die Beteiligung von Cryptochromen (CRY), Phototropinen (PHOT), Phytochromen (PHY) und Rezeptoren der Zeitlupe-Familie (ZTL) an verschiedenen lichtgesteuerten physiologischen Prozessen während des Lebenszyklus von *A. thaliana*. Veränderte Abbildung nach (Sullivan, 2003)

Entsprechend ihrer spektralen Eigenschaften können Photorezeptoren in verschiedene Klassen eingeteilt werden (siehe Abb. 2).



**Abb. 2.** Wirkungsspektren der pflanzlichen Photorezeptoren. Gezeigt sind sowohl der aktivierende als auch der inaktivierende Spektralbereich. *Veränderte Abbildung nach* (Kami et al., 2010).

Phytochrome sind Photorezeptoren, die vornehmlich Licht im roten bzw. dunkelroten Spektralbereich wahrnehmen. Sie wurden ursprünglich in Pflanzen entdeckt, kommen aber auch in filamentösen Pilzen und Prokaryoten vor (Hughes et al., 1997; Uliasz et al., 2008; Karniol et al., 2005; Brandt et al., 2008). Der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* besitzt fünf Phytochrome (phyA-phyE), die mit teilweise überlappender Funktion durch Genexpression physiologische Wachstums- und Differenzierungsprozesse wie Samenkeimung, De-Etiolierung der Keimlinge und den *shade avoidance response*, steuern.

Die Klasse der UV-A/Blaulichtrezeptoren wird in Cryptochrome (CRY), LOV (*Light Oxygen Voltage*)-Sensor Photorezeptoren, BLUF (*blue light sensors using flavin*)-Domänen Rezeptoren, und Xanthopsine untergliedert. Die Gruppe der LOV-Domänen basierten Photorezeptoren setzt sich in Pflanzen aus den Phototropinen (PHOT) und den Vertretern der Zeitlupe (ZTL)-Familie zusammen. In *A. thaliana* werden durch die UV-A/Blaulichtrezeptoren adaptive physiologische Prozesse wie De-Etiolierung, Phototropismus, Chloroplastenbewegung und Öffnung der Stomata gesteuert (Ahmad et al., 1995; Liscum and

Briggs, 1995a; Jarillo et al., 2001b; Kinoshita et al., 2001; Lin, 2002). Zusätzlich haben diese Photorezeptoren großen Einfluss auf die innere Uhr und die circadiane Rhythmik der Pflanzen. So wird beispielsweise die photoperiodische Blütenbildung durch Zusammenspiel von Cryptochromen und der ZTL-Familie reguliert und die endogene Rhythmik der Pflanze durch *photoreceptor cross-talk* zwischen Phytochromen und Cryptochromen synchronisiert (Casal and Boccalandro, 1995; Neff and Chory, 1998; Más et al., 2003).

Für die Wahrnehmung des UV-B Spektrums konnte im Jahr 2002 der schon längere Zeit postulierte aber bis dahin unbekannte UV-B Rezeptor UVR8 molekular charakterisiert werden (Rizzini et al., 2011; Heijde and Ulm, 2013).

## 1.2 Phytochrome

Für die Perzeption des Lichtes im rot-/dunkelroten Spektralbereich sind in Pflanzen sowie in andern Pro- und Eukaryoten die Phytochrome verantwortlich. Im Modellorganismus *A. thaliana* gibt es die fünf Phytochrome phyA – phyE (Butler et al., 1959; Clack et al., 1994; Sharrock and Quail, 1989; Rockwell et al., 2006;). Bei einer Größe von ca. 125 kDa sind diese recht großen Proteine strukturell in zwei Hauptdomänen unterteilt: Die Sensordomäne am N-Terminus bindet in höheren Pflanzen kovalent über eine Thioetherbrücke den offenkettigen Tetrapyrrol Phytochromobillin als Chromophor. Das Phytochromobillin ist im Wesentlichen an der Photochemie der Phytochrome beteiligt. Die C-terminale Effektdomäne hingegen ist maßgeblich für die Homo- und Heterodimerisierung und die Signaltransduktion sowie den Import in den Zellkern (Kevei and Nagy, 2003; Burgie and Vierstra, 2014).

Im Reaktionsmechanismus der Phytochrome ist der erste Schritt nach Lichtexposition die Photokonversion, eine lichtgetriebene Konformationsänderung zwischen der rotlichtabsorbierenden  $P_r$  (*red*) und der dunkelrotlichtabsorbierenden  $P_{fr}$  (*far-red*) Form. Verantwortlich für diese Konformationsänderung ist eine cis-/transisomerisierung im Phytochromobillin, die unter Rotlichtbestrahlung an der Doppelbindung zwischen dem C<sub>15</sub> und dem C<sub>16</sub> Atom entsteht. Diese Isomerisierung zieht eine Konformationsänderung des Holoproteins nach sich (Rudiger et al., 1983; Kneip et al., 1999). Wird die aktive  $P_{fr}$  Form mit Dunkelrotlicht bestrahlt, wird der Prozess der Isomerisierung rückgängig gemacht und das Phytochrom geht wieder in seine inaktive  $P_r$  Form über.

Die Signalperzeption und Signaltransduktion der Phytochrome läuft folgendermaßen ab:

Im Dunkel akkumuliert die inaktive, Rotlicht-absorbierende  $P_r$  Form. Bei Bestrahlung mit Rotlicht geht die  $P_r$  Form durch Photokonversion in die aktive  $P_{fr}$  Form über, wodurch physiologische Prozesse wie die Photomorphogenese ausgelöst werden. Bestrahlung mit Dunkelrotlicht oder eine Rückreaktion der thermodynamisch instabilen  $P_{fr}$  Form im Dunkel überführt die  $P_{fr}$  Form wieder in die inaktive  $P_r$  Form (Dunkelreversion) (Ruddat et al., 1997). Die cytosolisch lokalisierten Phytochrome werden nach dem Übergang in die  $P_{fr}$  Form in den Kern importiert, wo es zur Interaktion mit nachgeschalteten Signalpartnern kommt (Kevei et al., 2007). Dabei agieren Phytochrome zum einen als Inhibitoren von Transkriptionsfaktoren wie den *phytochrome interacting factors* (PIFs) oder dem E3 Ubiquitin Ligase Komplex, der von COP1 (*constitutive photomorphogenesis 1*) und SPA1 gebildet wird. Zum anderen aktivieren Phytochrome die Expression verschiedener Gene über Transkriptionsfaktoren wie HY5, welche im Dunkel durch COP1/SPA1 abgebaut werden. Auch gibt es einen regulatorischen Mechanismus der Phytochrome auf translationaler Ebene (*alternative splicing*) der zurzeit noch nicht vollständig verstanden ist.

Phytochrome kommen meist als Homodimere vor. PhyB bildet jedoch mit anderen lichtstabilen Phytochromen auch Heterodimere (Sharrock and Clack, 2004; Jones and Edgerton, 1994).

Physiologische Antworten, die von Phytochromen gesteuert werden sind im Wesentlichen vom Verhältnis der aktiven  $P_{fr}$  Form und der inaktiven  $P_r$  Form abhängig. Es wird zwischen zwei Klassen von Phytochromen unterschieden. Die  $P_{fr}$  Form der Typ-I-Phytochrome ist lichtlabil (PhyA in *A. thaliana*), wohingegen die  $P_{fr}$  Form der Typ-II-Phytochrome lichtstabil ist (PhyB-E in *A. thaliana*). Daher sind Phytochrome vom Typ I für physiologische Antworten bei extrem niedrigen Fluenzraten (*very low fluence response*, VLFR) und bei sehr hohen Fluenzraten im Dunkelrotlicht (*far-red high irradiance response*; FR-HIR) verantwortlich. Die lichtstabilen Phytochrome vom Typ-II vermitteln hingegen physiologische Antworten bei schwachen Fluenzraten (*low fluence response*; LFR) und bei intensiven Rotlicht-Fluenzraten (*red light high irradiance response*; R-HIR) (Quail, 2002).

Phytochrome wirken über den gesamten Lebenszyklus der Pflanze teils in speziellen, teils in überlappenden Funktionen auf das pflanzliche Wachstum und auf Differenzierungsprozesse ein (Smith et al., 1997; Monte et al., 2003; Franklin et al., 2003; Jung et al., 2016). Wichtige Stadien sind hierbei die Samenkeimung (Shinomura et al., 1996, 1994; Hennig et al., 2002), die Deetiolerung (Casal and Boccalandro, 1995; Franklin et al., 2003), die Blühinduktion und *shade-avoidance*-Reaktionen (Franklin and Whitelam, 2005).

### 1.3 UV-B Rezeptor UVR8

Für die Perzeption von Licht im UV-B Bereich (280-315 nm) ist der UV-B Rezeptor *UV Resistance Locus 8* (UVR8) verantwortlich, welcher durch ein Screening nach UV-hypersensitiven Mutanten von *A. thaliana* identifiziert werden konnte.

Die Domänenstruktur von UVR8 wird von sieben propellerartig angeordneten  $\beta$ -Faltblättern gebildet, die reich an Tryptophanen sind. UVR8 liegt im Dunkel als Homodimer vor. Im Gegensatz zu anderen Photorezeptoren benötigt UVR8 keinen zusätzlichen Chromophor zur Absorption des UV-Lichts. Die Tryptophanreste werden direkt durch Absorption von UV-B angeregt. Diese Anregung führt zur Änderung der Konformation und letztlich zur Monomerisierung von UVR8. Als Monomer wird UVR8 in den Zellkern importiert und kann dort mit *Constitutive Photomorphogenic 1* (COP1), auch einer Schlüsselkomponente in der Signaltransduktion von im sichtbaren Bereich des Lichtes aktivierten Photorezeptoren, interagieren. Diese Interaktion führt zur Expression des Transkriptionsfaktors HY5, der für die Regulation einer Vielzahl von UV-B-gesteuerten Genen verantwortlich ist.

Die biologischen Funktionen von UVR8 sind hauptsächlich adaptiver Natur. Hierzu gehören beispielsweise die Bildung von Schutzpigmenten gegen UV-Strahlung, Steuerung der Blattentwicklung, Pathogenabwehr, Synchronisation der inneren Uhr und Photomorphogenese.

### 1.4 UV-A und Blaulicht-Photorezeptoren

Da in der vorliegenden Arbeit an Cryptochrome 1 aus *A. thaliana* gearbeitet wurde, wird an dieser Stelle nur auf die Vertreter der UV-A und Blaulichtrezeptoren näher eingegangen, die auch in höheren Pflanzen vorkommen.

#### 1.4.1 LOV-Sensor Proteinfamilie

LOV-Sensor Proteine bilden eine Unterklasse der Period-ARNT-Single-minded (PAS)-Domänen Proteinsuperfamilie (Ito et al., 2012). LOV/PAS-Domänen weisen eine charakteristische konservierte  $\alpha/\beta$ -Faltung auf, deren zentrales Gerüst aus einer Faltung aus

fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern besteht. Im Unterschied zu herkömmlichen PAS-Domänen weist die aus ~100 Aminosäuren bestehende LOV-Domäne an einer Flanke des  $\beta$ -Faltblatt-Gerüsts eine Reihe von  $\alpha$ -Helices auf, die mit einem FMN-Kofaktor assoziiert sind. Des Weiteren weisen LOV-Domänen ein konserviertes GXNCRFLQ-Motiv auf, dessen zentrales Cystein bei Blaubelichtung eine kovalente Bindung mit der C4a Position des Flavinkofaktors eingeht (Huala et al., 1997; Crosson et al., 2003). Diese kovalente Bindung wird bei Rückkehr in den dunkel-adaptierten Zustand wieder aufgelöst.

Als erstes Mitglied der LOV-Sensor Proteine wurde 1997 NPH1 (*nonphototropic hypocotyl 1*) (heute Phototropin 1) in *A. thaliana* identifiziert und charakterisiert (Huala et al., 1997). Im Laufe der Zeit wurden weitere Photorezeptoren mit LOV-Domänen als Komponenten des Blaulicht-Signalweges bei Pflanzen (Somers et al., 2000; Imaizumi et al., 2003), Bakterien (Losi et al., 2002; Purcell et al., 2007) und Pilzen (He et al., 2002; Schwerdtfeger und Linden, 2003) entdeckt.

### **Photozyklus der LOV-Domäne**

Die LOV-Domäne liegt im Grundzustand assoziiert mit einem oxidierten Flavinkofaktor vor (siehe Abb. 5). Der Isoalloxazinring des Flavins liegt dabei direkt unterhalb des aktiven Zentrums des benachbarten Cysteinrestes. Dieser Grundzustand hat ein für Flavine charakteristisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 450 nm (Abb. 4). Bei Anregung durch Blaulicht geht das Flavin in einen angeregten Singulett-Zustand über, der unverzüglich in einen Triplet-Zustand umgewandelt wird. Dadurch wird ein Elektronentransfer zwischen dem Flavin und dem nahstehenden Cystein eingeleitet, wodurch ein Flavinsemichinon und ein Cystein-Radikal entstehen. Im Folgenden reagieren beide Radikale miteinander und bilden ein C4a Addukt, dessen Bildung die Protonierung des benachbarten N5-Atoms bewirkt. Das Absorptionsspektrum des C4a Adduktes verschiebt sich in den UV-A Bereich mit einem Absorptionsmaximum bei 390 nm (Abb. 3 & Abb. 4).



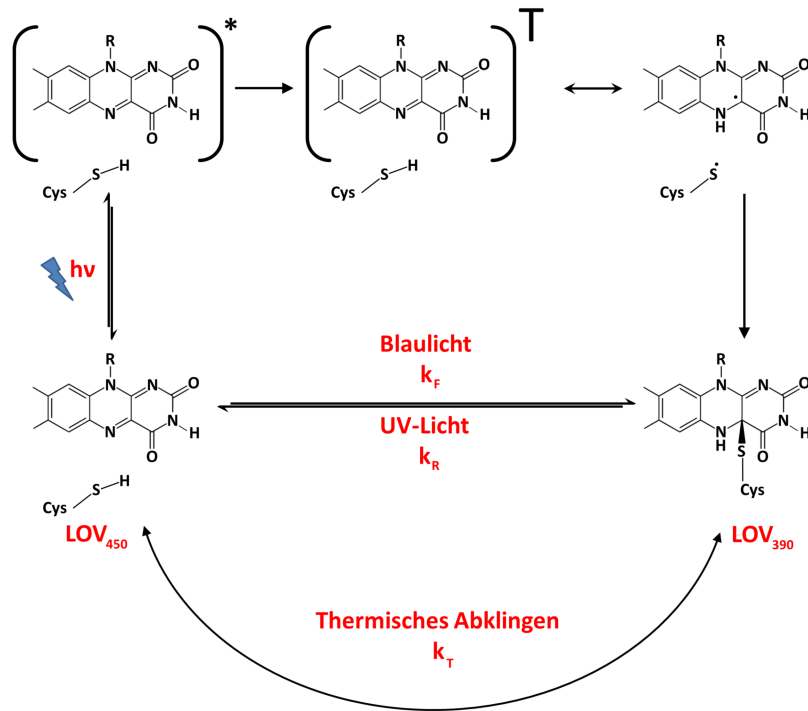


Abb. 3. Photozyklus der LOV-Domäne. Modifizierte Abbildung nach (Zoltowski and Imaizumi, 2014)

Der Zerfall des Adduktes tritt im Dunkel spontan auf und die LOV-Domäne kehrt wieder in den Grundzustand zurück. Eine photochemische Überführung des Adduktes in den Grundzustand kann auch durch UV-Belichtung herbeigeführt werden (Kennis et al., 2004).

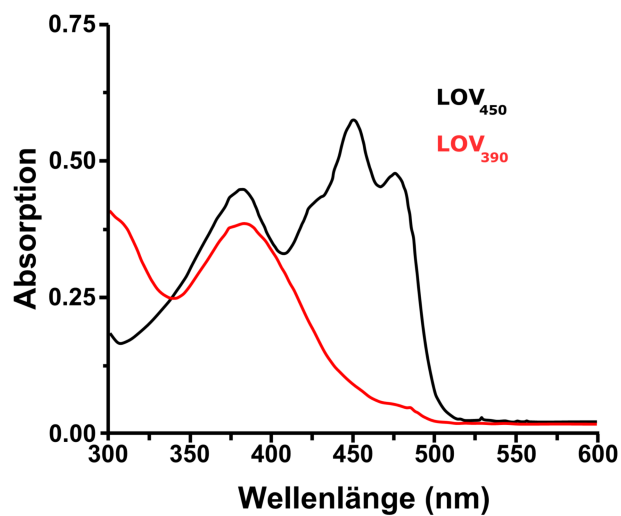
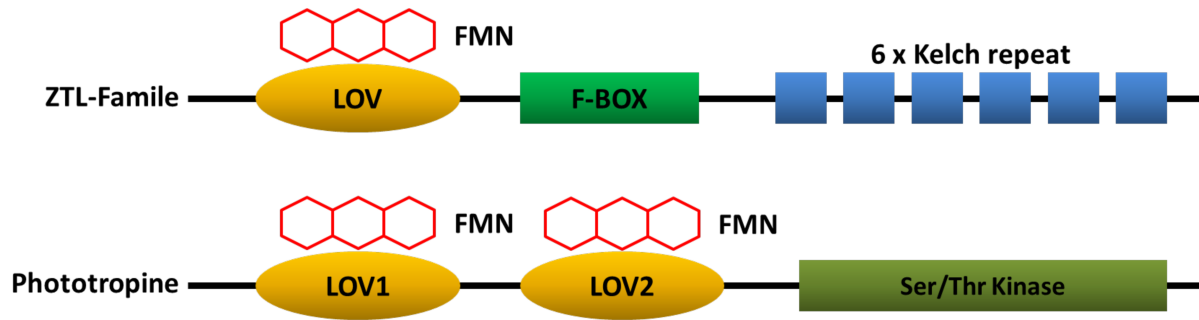


Abb. 4. Verschiebung des Absorptionsspektrums der LOV-Domäne. Modifizierte Abbildung nach (Zoltowski und Imaizumi, 2014)



**Abb. 5. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Vertretern der LOV-Sensor Proteinfamilie in höheren Pflanzen.** Die LOV-Domäne mit dem gebundenen FMN-Molekül dient als photosensorische Domäne für Blaulicht. Mitglieder der ZTL-Familie besitzen eine N-terminale LOV-Domäne, gefolgt von einer F-Box Domäne und sechs Kelch repeats am C-Terminus. Phototropine verfügen dagegen über zwei LOV-Domänen am N-Terminus und eine C-terminale Ser/Thr Kinase-Domäne. *Veränderte Abbildung nach* (Ito et al., 2012).

#### 1.4.2 Phototropine

Die zur LOV-Sensor Proteinfamilie gehörenden Phototropine kommen ubiquitär in höheren Pflanzen vor (Elliott et al., 2004; Kanegae et al., 2000; Reymond et al., 1992) und regulieren eine Vielzahl an physiologischen Lichtantworten, die dazu dienen, die Effizienz der Photosynthese zu steigern und Lichtschäden zu vermeiden. Zu diesen Antworten gehören das lichtgesteuerte Richtungswachstum (Phototropismus) der Pflanze (Sakai et al., 2001), das Öffnen der Stomata (Kinoshita et al., 2001), die Enfaltung der Kotyledonen und die Chloroplastenbewegungen (Wada et al., 2003). *A. thaliana* besitzt zwei Phototropine, phot1 und phot2 (Sakai et al., 2001; Celaya and Liscum, 2004), die bei der Regulation dieser physiologischen Bewegungsprozesse teilweise überlappende und teilweise eigenständige Rollen übernehmen. Zu den Prozessen, die von phot1 und phot2 gemeinschaftlich reguliert werden gehören das phototrophe Wachstum des Hypokotyls unter starker unilateraler Blaulichteinstrahlung (Sakai et al., 2001), das Öffnen der Stomata (Kinoshita et al., 2001), die Chloroplastenbewegung bei Schwachlicht (*accumulation response*) und das Entfalten der Kotyledonen. Das phototrophe Wachstum unter Schwachlichtbedingungen (Sakai et al., 2001; Liscum and Briggs, 1995b) und die bei Blaulicht-Belichtung schnell einsetzende Inhibierung des Hypokotylwachstums bei im Dunkel gewachsenen Keimlingen werden einzig durch phot1 gesteuert (Folta and Spalding, 2001). Die Ausweichbewegung der Chloroplasten bei starkem Lichteinfall hingegen ist ein Schutzmechanismus für das photosynthetische System und wird ausschließlich durch phot2 vermittelt (Jarillo et al., 2001b; Kagawa et al., 2001).

Phototropine verfügen über eine N-terminale photosensorische Domäne bestehend aus zwei einander ähnliche LOV-Domänen, die als LOV1 und LOV2 bezeichnet werden und als Kofaktor jeweils FMN nicht-kovalent (im Dunkelzustand) gebunden haben, und eine C-terminale Serin/Threonin-Kinase Domäne (Huala et al., 1997) (Abb. 5). Beide Domänen sind über einen flexiblen  $\alpha$ -helikalen Bereich, die sogenannte  $J\alpha$ -Helix, miteinander verbunden.

Innerhalb der Zelle sind Phototropine vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert (Sakamoto and Briggs, 2002; Kong et al., 2006). Sie sind jedoch keine integralen Membranproteine, sondern sind an der intrazellulären Seite der Plasmamembran angeheftet. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass sowohl phot1 als auch phot2 an der Außenmembran von Chloroplasten lokalisiert sind (Kong et al., 2013).

### **Aktivierung und Signalweiterleitung**

Im inaktiven Dunkelzustand reprimiert eine über die  $J\alpha$ -Helix vermittelte Anlagerung des C-Terminus an die LOV2-Domäne im N-Terminus die Aktivität der C-terminalen Kinase-Domäne. Bei lichtinduzierter Aktivierung der LOV-Domänen wird FMN kovalent gebunden, wodurch eine Konformationsänderung durch Bildung des C4a-Adduktes ausgelöst wird (Christie et al., 2007; Tokutomi et al., 2008; Crosson and Moffat, 2002). Diese führt dazu, dass die Kinase-Domäne für ATP zugänglich wird (Pfeifer et al., 2010). Durch nachfolgende Autophosphorylierung kann eine Interaktion mit weiteren Signalkomponenten erfolgen (Salomon et al., 2003; Christie et al., 1998). Durch kristallographische Studien wurde gezeigt, dass in dem Bereich zwischen LOV1 und LOV2 ein weiterer helikaler Bereich lokalisiert ist (Kong et al., 2013). Diese Region wird als A' $\alpha$ -Helix bezeichnet und scheint, wie auch die  $J\alpha$ -Helix, eine wichtige Funktion bei der Photorezeptoraktivierung zu übernehmen, da Mutationen in diesem Bereich bei Phototropin aus *Chlamydomonas reinhardtii* die Reprimierung der Kinase-Aktivität im Dunkeln aufheben (Aihara et al., 2012).

Bislang identifizierte *downstream* Signalkomponenten von Phototropinen sind die in Schließzellen vorkommende Kinase *blue light signaling 1* (BLUS1) (Takemiya et al., 2013), *non-phototropic hypocotyl 3* (NPH3) (Roberts et al., 2011), *root phototropism 2* (RPT2) (Sakai et al., 2000; Inada et al., 2004), der Auxin-Efflux Transporter ABCB19 (Spalding, 2013) und PKS4 als Mitglied der Phytochrome Kinase Substrate (PKS) Familie (Demarsy et al., 2012).

### 1.4.3 Zeitlupe-Familie

Eine weitere Gruppe an LOV-Sensor Proteinen bilden die Mitglieder der Zeitlupe-Familie. In *A. thaliana* wurden Zeitlupe (*ztl*) (Somers et al., 2000), *Flavin-binding Kelch repeat F-box 1* (*fkf1*) (Nelson et al., 2000) und *LOV Kelch protein 2* (*lkp2*) (Schultz et al., 2001a) als LOV-Sensor Proteine identifiziert. Sie übernehmen wichtige Rollen bei der Stabilisierung oder dem Abbau von Regulatoren der Inneren Uhr und der photoperidischen Blütenbildung, wobei sie in ihren jeweiligen Funktionen überlappen (Schultz et al., 2001b; Takase et al., 2011; Fornara et al., 2009a).

Strukturell bestehen die Mitglieder der ZTL-Familie aus einer N-terminalen, mit oxidiertem FMN assoziierten LOV-Domäne, einer F-Box und einem sechsfachen Kelch-Motiv (siehe Abb. 5). Die F-Box vermittelt den proteasomalen Abbau über *Skp Cullin F-box* (SCF) E3 Ubiquitin-Ligasen (Ito et al., 2012), wohingegen die Kelch-Wiederholungen die Heterodimerisierung von *fkf1* und *ztl* mit *lkp2* ermöglichen (Takase et al., 2011).

### Signaltransduktion und Signalkomponenten

Die blaublichtabhängige Aktivierung von Mitgliedern der ZTL-Familie erfolgt entsprechend dem Modell des Photozyklus der LOV-Domäne (siehe Abb. 3). Im Unterschied zu Phototropinen jedoch ist die Lebensdauer des C4a-Adduktes bei *fkf1* (Zikihara et al., 2006) und *ztl* deutlich verlängert (Pudasaini und Zoltowski, 2013). Es wird spekuliert, dass die verlängerte Lebensdauer des signalaktiven Zustandes von *fkf1* und *ztl* ein genaues Bemessen der Tageslänge ermöglicht (Christie et al., 2015).

Die Mitglieder der ZTL-Familie regulieren in *A. thaliana* die zeitliche Steuerung von biologischen Prozessen, indem sie die Stabilität wichtiger Signalkomponenten im Signalweg beeinflussen. So wird beispielsweise der Transkriptionsrepressor *Timing of CAB expression 1* (TOC1), der zusammen mit anderen Regulatoren die Expression von Komponenten der inneren Uhr steuert, durch *ztl* posttranskriptionell reguliert (Fujiwara et al., 2008). Über die LOV-Domäne wird die blaublichtinduzierte Bindung von *ztl* an Gigantea (GI) vermittelt, wodurch die SCF-Aktivität von *ztl* unterdrückt wird. Dies führt zu einer Akkumulation von TOC1, wodurch die Transkription von Kernkomponenten der inneren Uhr eingeleitet wird (Schultz et al., 2001c; Más et al., 2003). Die Bindung von GI durch *ztl* führt

einerseits zu einer gegenseitigen Stabilisierung beider Proteine und andererseits wird die Verteilung von GI im Kernplasma durch ztl gesteuert (Kim et al., 2013, 2007).

Auch *fkf1* bindet GI blaulichtabhängig, wodurch es, im Gegensatz zur Bindung durch ztl, zu einer erhöhten F-Box-vermittelten SCF-Aktivität von *fkf1* kommt. Die Gesteigerte SCF-Aktivität von *fkf1* führt zum Abbau von CDF1, einem Repressor der Transkription von *CONSTANS* (CO) (Fornara et al., 2009b; Sawa et al., 2007). Diese transkriptionelle Regulation von CO führt unter Langtagbedingungen letztendlich zur Transkription von *Flowering Locus T* (FT), dem Transkriptionsregulator der Blühinduktion (Andrés und Coupland, 2012). Neben der transkriptionellen Regulation von CO über *fkf1* kommt es auch auf posttranskriptionaler Ebene zu einer Regulation von CO durch *fkf1*, indem das CO-Protein durch Bindung von *fkf1* stabilisiert wird (Song et al., 2012).

#### **1.4.4 Die Photolyase/Cryptochrom-Proteinfamilie**

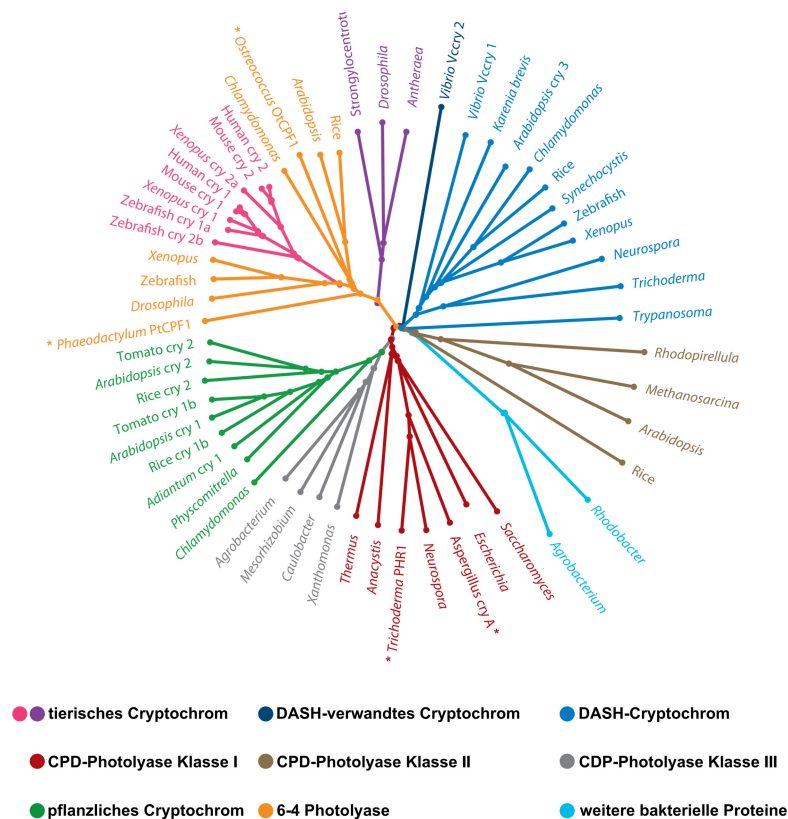
Mitglieder dieser sehr großen Superfamilie photoaktiver Proteine finden sich sowohl in Archaeen, Bakterien und Eukaryoten, als auch in Viren. Systematisch untergliedert sich diese Proteinfamilie in drei Hauptkategorien: die CPD (*cyclobutane pyrimidine dimer*)-Photolyasen mit den Klassen I-III, (6-4) Pyrimidin-Pyrimidon Photolyasen und die Cryptochrome.

Photolyasen sind DNA-Reparaturenzyme, die durch Nutzung von Lichtenergie UV-induzierte DNA-Schäden reparieren. Cryptochrome weisen zwar Sequenzhomologie zu Photolyasen auf, sind aber dadurch definiert, dass sie keine oder nur verminderte DNA-Reparaturaktivität besitzen und als lichtgesteuerte Signalmoleküle fungieren. Entsprechend dieser Definition gibt es zwei Unterfamilien der Cryptochrome: pflanzliche Cryptochrome (unterteilt in *cry1*, *cry2* und deren Homologe) und tierische Cryptochrome (unterteilt in Insekten-Cryptochrome Typ I und Säugetier-Cryptochrome Typ II). Neben diesen als „klassische“ Cryptochrome bezeichneten Unterfamilien bilden die cry-DASH Cryptochrome eine dritte Unterfamilie, die sich dadurch auszeichnet, dass ihre Vertreter die Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Schäden beibehalten haben.

## Evolution der Photolyase/Cryptochrom-Familie

Ein allgemein anerkanntes Modell zur Evolution der Photolyase/Cryptochrom-Familie wurde 1997 von Kanai vorgestellt (Kanai et al., 1997). Es besagt, dass das Ursprungsmolekül des Familienstammbaums eine CPD Photolyase war. Durch mehrere Genverdopplungen hat sich die gesamte Photolyase/Cryptochrom-Familie im Laufe der Evolution daraus entwickelt.

Von Cashmore wurde 1999 erstmals postuliert, dass die Cryptochrome sich erst nach der Aufspaltung von Prokaryoten und Eukaryoten aus einem Vorläufer der CPD-Photolyasen in Tieren und Pflanzen unabhängig voneinander entwickelt haben (Cashmore, 1999). Diese Hypothese wurde nach der Entdeckung von prokaryotischen Cryptochromen jedoch angezweifelt.



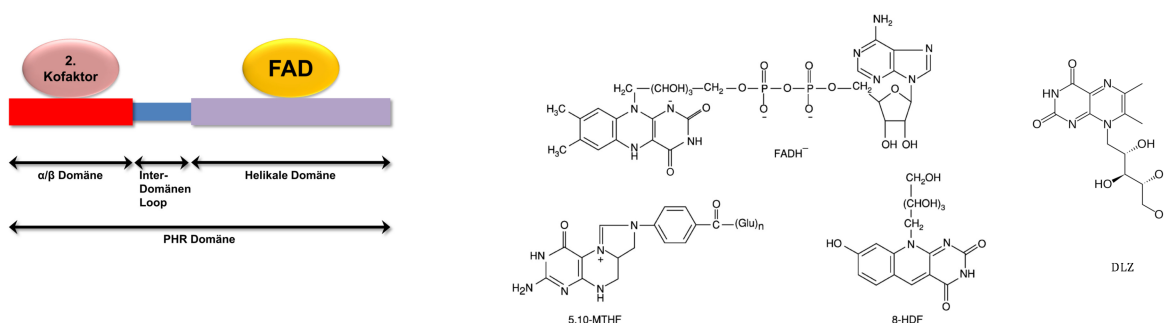
**Abb. 6. Stammbaum der Photolyase/Cryptochrom-Proteinfamilie.** Cryptochrome (pflanzliche und tierische Cryptochrome), DASH- und DASH-verwandte Cryptochrome, CPD-Photolyasen Klasse I-III, (6-4) Photolyasen und weitere bakterielle Proteine bilden gemeinsam die Photolyase/Cryptochrom Proteinfamilie. Die mit (\*) gekennzeichneten Vertreter besitzen sowohl DNA-Reparatureigenschaften als auch Signalmolekülfunktion. *Veränderte Abbildung nach* (Chaves et al., 2011).

Die Annahme eines gemeinsamen Ursprungs von tierischen und pflanzlichen Cryptochromen wurde durch die Entdeckung der DASH-Cryptochrome gestützt. Die Mitglieder der DASH-Cryptochrome sind in Pilzen, Pflanzen, Archeen, Bakterien und Wirbeltieren zu finden und besitzen Photolyaseaktivität. Das DASH-Cryptochrom cry3 aus *A. thaliana* weist zudem eine engere Verwandtschaft zu dem prokaryotischen DASH Cryptochrom aus *Synechocystis sp* auf als zu cry1 und cry2 aus *A. thaliana*. Dies lässt die Annahme zu, dass Pflanzen das DASH-Cryptochrom durch horizontalen Gentransfer von dem Endosymbionten erhalten haben, aus dem die Plastiden hervorgegangen sind (Kleine et al., 2003). Somit könnten die DASH-Cryptochrome möglicherweise als evolutionäres Bindeglied den Übergang von Photolyasen zu Cryptochromen darstellen. In einem Stammbaum von Chaves et al. (2011) ist die Phylogenie der Mitglieder der Photolyase/Cryptochrom-Familie gezeigt (siehe Abb. 6).

Demnach werden Photolyasen nach Substratspezifität und Sequenzhomologien den CPD-Photolyasen Klasse I bis III und den (6-4)-Photolyasen zugeordnet. Die Cryptochrome werden durch die Subfamilien der pflanzlichen Cryptochrome, der tierischen Cryptochrome, unterteilt in Insekten Cryptochrom Typ I und Säugetier Cryptochrom Typ II, und der DASH Cryptochrome einschließlich DASH-Cryptochrom verwandten Mitgliedern repräsentiert. Der gezeigte Stammbaum lässt sich hinsichtlich der Cryptochrome in drei Hauptäste gliedern. Die pflanzlichen Cryptochrome bilden gemeinsam mit den CPD-Photolyasen der Klassen I und III einen dieser Hauptäste, wodurch die enge Verwandtschaft zwischen pflanzlichen Cryptochromen und CPD-Photolyasen verdeutlicht wird. In einem weiteren Hauptast gruppieren die tierischen Cryptochrome, unterteilt in Insekten Cryptochrom Typ I und Säugetier-Cryptochrom Typ II, mit den (6-4)-Photolyasen. Den dritten Hauptast bilden die DASH-Cryptochrome und DASH-Cryptochrom assoziierten Vertreter zusammen mit den CPD Photolyasen Klasse II. Aufgrund neuer Veröffentlichungen findet sich in diesem Hauptast auch eine weitere Gruppe von (6-4)-Photolyasen, die sich in Proteobakterien findet. Diese Gruppe zeichnet sich durch das Vorkommen eines Eisen-Schwefel-*Clusters* als weiterer Kofaktor und einem 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin als Antennenchromophor aus (Oberpichler et al., 2011; von Zadow et al., 2016).

## Strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten

Die Mitglieder der Photolyase/Cryptochrom-Familie (CPF) besitzen eine starke Ähnlichkeit in der Struktur ihrer photoaktiven N-terminalen Domäne. Diese als PHR-Domäne (*photolyase-homologous region*) bezeichnete Region hat eine Länge von etwa 450-550 AS. Die Domänenarchitektur der PHR-Domäne ist in der gesamten Proteinfamilie hoch konserviert und setzt sich im Wesentlichen aus zwei Subdomänen zusammen: Die N-terminale Subdomäne ist durch  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter gekennzeichnet und wird daher auch als  $\alpha/\beta$ -Domäne bezeichnet (Todo, 1999; Brautigam et al., 2004). Bei manchen Vertretern der CPF ist hierin zweiter Kofaktor nicht-kovalent gebunden, der als Antennenpigment fungiert. Bisher wurden FMN, FAD, 8-Hydroxydeazaflavin (8-HDF), Methenyltetrahydrofolat (MTHF) und 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ) als Antennenchromophor identifiziert (siehe Abb. 7).



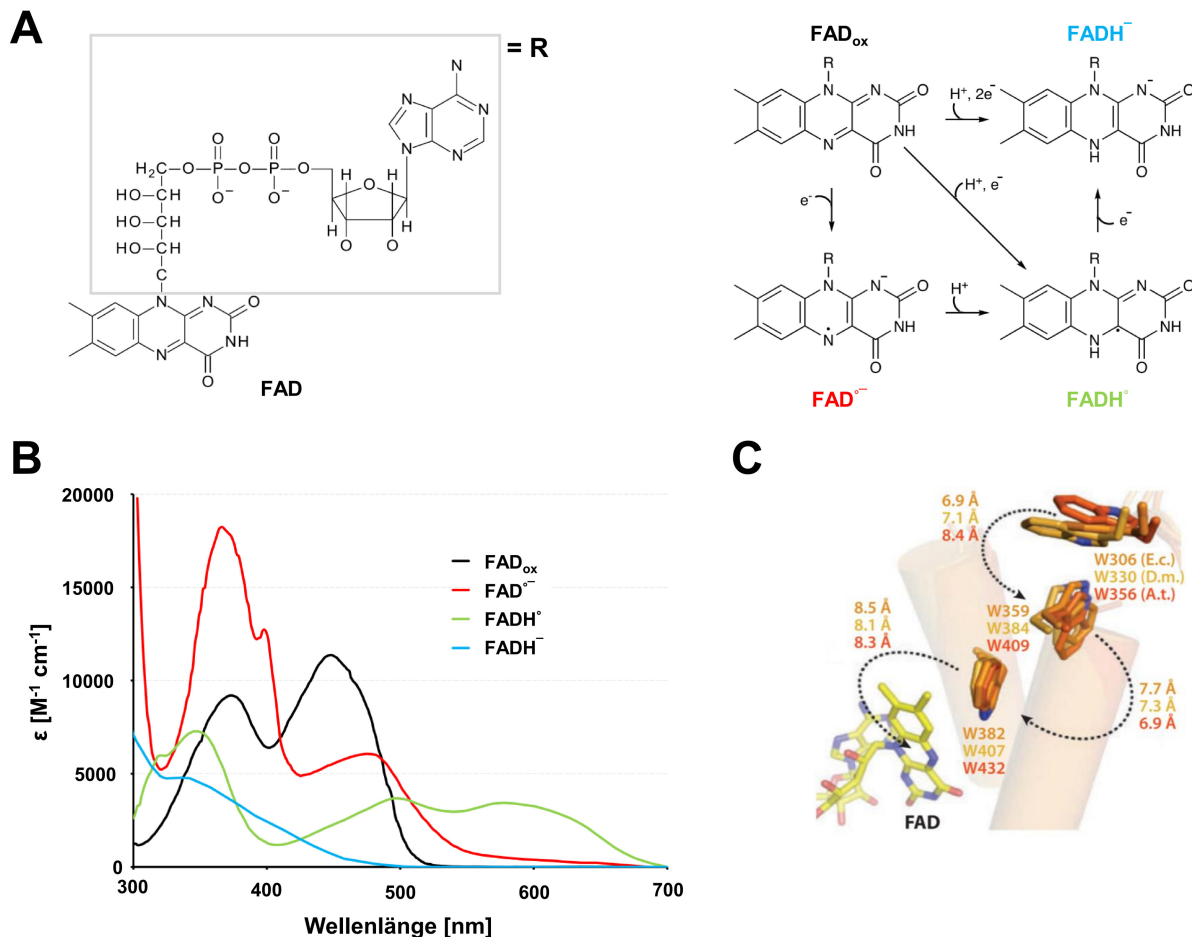
**Abb. 7. Schematische Darstellung der PHR-Domäne.** Die N-terminale  $\alpha/\beta$ -Subdomäne bindet, aber nicht in allen CPF Vertretern, den zweiten Kofaktor als Antennenpigment und ist über einen Inter-Domänen Loop mit der helikalen Domäne verbunden, die als katalytischen Kofaktor FAD nicht-kovalent gebunden hat. Die rechte Seite der Abbildung zeigt Nukleotide, die als Antennenpigmente der Photolyase/Cryptochrom-Familie identifiziert wurden. *Veränderte Abbildung nach* (Todo, 1999)(Sancar, 2004).

Die C-terminale Subdomäne der PHR-Domäne wird als helikale Domäne bezeichnet, da sie hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices besteht. Die helikale Domäne bindet den katalytischen Kofaktor FAD nicht-kovalent in einer U-förmigen Konformation. Anders als der Antennenchromophor, ist der katalytische Kofaktor innerhalb der Photolyase/Cryptochrom-Familie immer FAD. Das FAD ist für die Photochemie der Cryptochrome und der Photolyasen essentiell (Sancar et al., 1987; Sancar et al.; Jorns et al., 1987), da sowohl die katalytische Aktivität der Photolyasen als auch die Funktion als Photorezeptor im Fall der Cryptochrome durch die Redoxzustände des Flavins lichtabhängig gesteuert werden (siehe Abb. 8; A,B). Der zweite Kofaktor ist weder für die Photochemie noch für die Substratbindung und Katalyse der Photolyasen



notwendig, aber er verbessert unter Schwachlichtbedingungen die Quantenausbeute durch seinen hohen Absorptionskoeffizienten und führt zu einer Verbreiterung des Absorptionsspektrums des Holoproteins. Die Anregungsenergie der absorbierten Photonen gibt er dabei über Förster Energietransfer an das FAD weiter (Sancar, 2004).

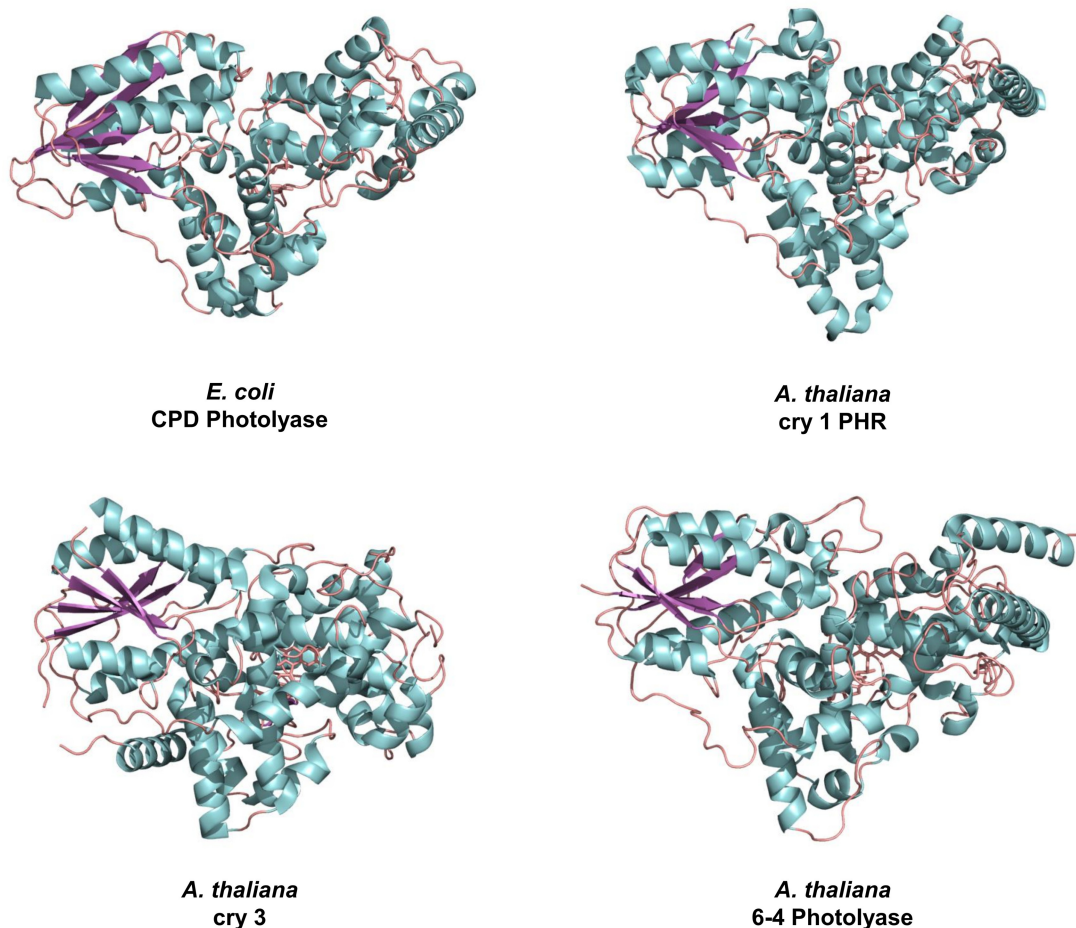
Obwohl sich die Grundzustände und die aktiven Zustände des FAD innerhalb der CPF unterscheiden, nutzen alle Mitglieder zur Reduktion des Flavins die gleiche intramolekulare Elektronentransportkette. Diese Kette wird vom FAD bis zur Proteinoberfläche von drei hoch konservierten Tryptophanen (an der Proteinoberfläche auch teilweise Tyrosin) gebildet und sie verbindet das FAD im aktiven Zentrum mit der Proteinumgebung (Aubert et al., 2000; Li et al., 1991). Diese Anordnung der Tryptophane wird auch als Tryptophantriade bezeichnet.



**Abb. 8. Redoxzustände von FAD, ihre Absorptionsspektren und die Tryptophantriade.** (A) Gezeigt wird ein FAD-Molekül und verschiedene Redoxzustände des Flavins: Oxidiertes Flavin (FAD<sub>ox</sub>), anionisches Radikal (FAD<sup>•-</sup>), semireduziertes Radikal (FADH<sup>•</sup>) und vollständig reduziertes Flavon (FADH<sup>-</sup>). *Veränderte Abbildung nach* (Conrad et al., 2014). (B) Absorptionsspektren der unter (A) gezeigten FAD-Spezies. Die Spektren gehen auf folgende Quellen zurück: Oxidiertes FAD (FAD<sub>ox</sub>) (Islam et al., 2003); anionisches (FAD<sup>•-</sup>) und semireduziertes (FADH<sup>•</sup>) Radikal (Palfey and Massey, 1998); vollständig reduziertes FAD (FADH<sup>-</sup>) (Müller, 1991). (C) Die konservierte Tryptophantriade verbindet das FAD im aktiven Zentrum über das proximale, mediale und distale Tryptophan mit der Umgebung des Proteins. Gezeigt ist eine Überlagerung der Tryptophantriaden der *E. coli* CPD-Photolyase (E.c.), der (6-4)-Photolyase aus *Drosophila melanogaster* (D.m.) und dem DASH-Cryptochrom cry3 aus *A. thaliana* (A.t.). *Abbildung aus* (Chaves et al., 2011).

Kommt es zur Absorption eines Photons durch ein oxidiertes oder semireduziertes Flavin, geht das Flavin in einen angeregten Zustand über und entzieht dem proximalen Tryptophan ein Elektron. Es entsteht ein Tryptophanradikal, welches wiederum dem medialen Tryptophan ein Elektron entzieht. Das mediane Tryptophan geht dadurch in den Radikalzustand über und entzieht dem distalen oberflächenständigen Tryptophan ein Elektron. Da das Oberflächentryptophan mit der Proteinumgebung in Berührung steht, kann es durch einen externen Elektronendonator wieder reduziert werden und der Elektronentransport kann erneut stattfinden (siehe Abb. 8; C).

Betrachtet man die Kristallstrukturen verschiedener Mitglieder der CPF im Vergleich, stellt man fest, dass sich die Ähnlichkeiten auf der Ebene der Sekundärstrukturen in einer starken Ähnlichkeit der gesamten Oberflächenarchitektur und Proteinform widerspiegeln (siehe Abb. 9).



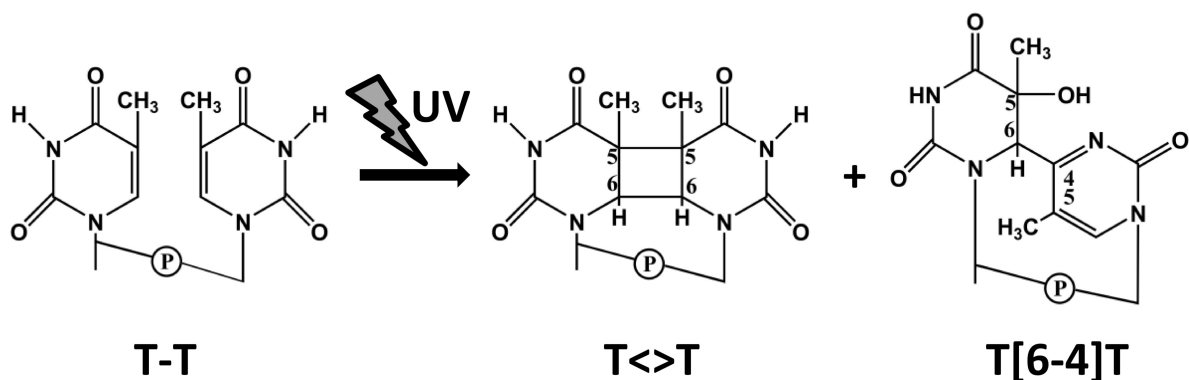
**Abb. 9. Vergleich der Strukturen von Mitgliedern der Photolyase/Cryptochrom-Familie.** Die Abbildung zeigt die strukturelle Ähnlichkeit zwischen CPD-Photolyase aus *E. coli* (PDB 1DNP), der PHR-Domäne von Cryptochrom 1 aus *A. thaliana* (PDB 1U3C), dem DASH-Cryptochrom cry3 aus *A. thaliana* (PDB 2IJG) und der (6-4) Photolyase aus *A. thaliana* (PDB 3FY4). Dargestellte Sekundärstrukturen:  $\alpha$ -Helix (türkis),  $\beta$ -Faltblatt (lila), Loop-Struktur (rot).

### 1.4.4.1 Photolyasen

Neben den Eigenschaften von Licht als Energie- und Signalträger zu dienen, birgt es für Organismen auch Gefahren. Hierbei kann besonders der UV-Anteil des Lichtes dazu führen, dass Modifikationen in den Nukleotiden der Nukleinsäuren entstehen, die zu Mutationen führen und so letztlich sogar letale Folgen für Lebewesen haben können. Im Verlauf der Evolution haben Organismen Mechanismen entwickelt, um sich vor diesen schädlichen Auswirkungen zu schützen. Einen dieser Schutzmechanismen stellen die Photolyasen dar. In einem Prozess, der als Photoreaktivierung bezeichnet wird, sind diese Enzyme in der Lage, UV-induzierte DNA-Schäden unter Verwendung eines lichtgetriebenen zyklischen Elektronentransfers zwischen Enzym und geschädigter DNA zu reparieren.

Diese Photoreaktivierung wurde in den 1940er Jahren von Kelner und Dulbecco beschrieben und charakterisiert. Beide Forscher stellten unabhängig voneinander fest, dass UV-exponierte Bakterien eine höhere Überlebensrate aufwiesen, wenn sie direkt nach der UV-Bestrahlung mit Weißlicht belichtet wurden (Kelner, 1949; Dulbecco, 1949). Die molekularen Mechanismen, die der Photoreaktivierung zugrunde liegen, wurden dann 1958 von Rupert entdeckt und näher beschrieben. Rupert stellte fest, dass zwei benachbarte Pyrimidine in Nukleinsäuren durch UV-Einwirkung ein Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) bilden können. Dieser Schaden kann durch Photolyasen unter Verwendung von Blaulicht photoenzymatisch repariert werden (Rupert et al., 1958; Rupert, 1962a, 1962b, 1960).

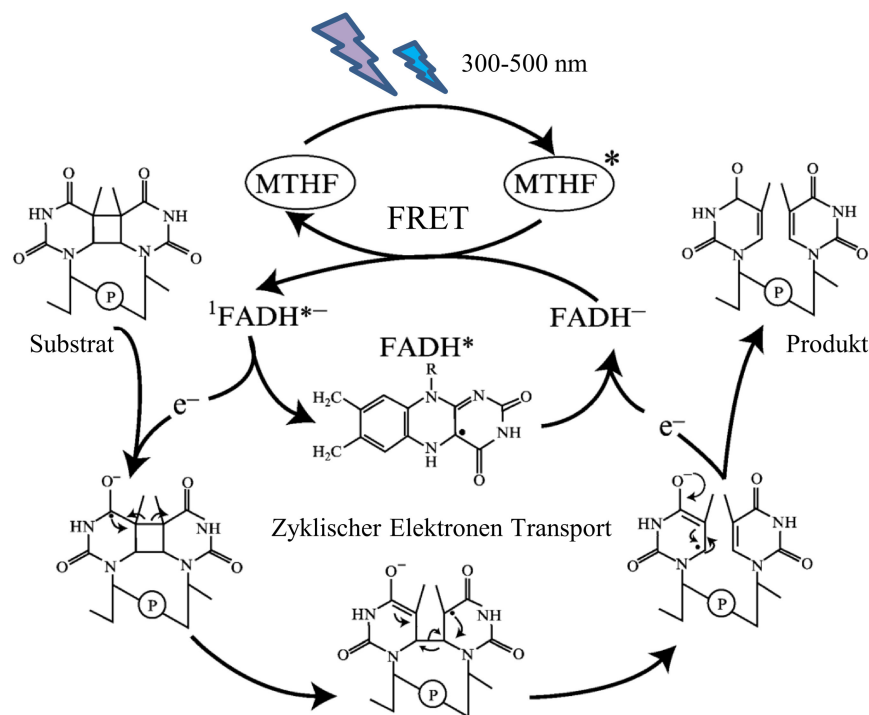
Heute weiß man, dass von allen UV-induzierten DNA-Schädigungen die CPD-Schäden mit 70-80% am häufigsten vorkommen. Eine weitere mögliche UV-induzierter DNA-Schädigung sind Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukte (kurz als (6-4)-PP bezeichnet).



**Abb. 10. Bildung von Photoprodukten in Nukleinsäuren.** Unter Einwirkung von UV-Strahlung kann es bei benachbarten Pyrimidinen (T-T) zur Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (T<>T) oder Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukten kommen. *Veränderte Abbildung nach (Sancar, 2008).*

Die (6-4)-PP treten mit 10-20% aller gebildeten UV-Schädigungen weniger häufig auf. Photolyasen werden aufgrund ihrer Substratspezifität in die Untergruppen CPD-Photolyasen und (6-4)-Photolyasen unterteilt (siehe Abb. 10), wobei die CPD-Photolyasen durch Auswertung von Sequenzanalysen in drei Klassen eingeteilt werden: CPD-Photolyasen der Klasse I finden sich hauptsächlich in Mikroorganismen, wohingegen Klasse II CPD-Photolyasen in Archeen und höheren Eukaryoten identifiziert wurden. Die CPD-Photolyasen der Klasse III wiederum weisen eine enge Verwandtschaft mit den pflanzlichen Cryptochromen auf, zu denen sie eine Schwestergruppe bilden (siehe Abb. 6).

Photolyasen sind monomere Proteine mit etwa 450-550 AS. Durch ihre Funktion als DNA-Reparaturenzyme kommen sie ubiquitär in fast allen Pro- und Eukaryoten vor. Eine Ausnahme bilden hierbei die Plazentartier (Yasuil et al., 1994; Sancar, 2016, 2004).



**Abb. 11. Reaktionsmechanismus der CPD-Photolyasen.** Veränderte Abbildung nach (Sancar, 2004)

#### 1.4.4.2 cryDASH-Proteinfamilie

Der Begriff der DASH-Cryptochrome wurde 2003 von Brudler et al. (Brudler et al., 2003) für eine neuentdeckte Unterklasse der Photolyase/Cryptochrom-Proteinfamilie vorgeschlagen. Obwohl die ersten Vertreter dieser neuen Gruppe in *Arabidopsis* und *Synechocystis* beschrieben wurden, legten erste phylogenetische Analysen einen Verwandtschaft zu tierischen Cryptochromen nahe (Hitomi, 2000; Brudler et al., 2003), weswegen der Begriff DASH-Cryptochrome (DASH steht hierbei für **D***rosophila* **A***rabidopsis* **S***ynechocystis* **H***omo*) gewählt wurde. Durch den gewählten Begriff wurde impliziert, dass tierische Cryptochrome und DASH-Cryptochrome einen gemeinsamen Vorfahren haben. Neuere phylogenetische Untersuchungen zeigten jedoch, dass DASH-Cryptochrome und tierische Cryptochrome keinen gemeinsamen Ursprung teilen, sondern die DASH-Cryptochrome zusammen mit den pflanzlichen Cryptochromen und den CPD Photolyasen der Klassen I-III auf einen gemeinsamen Vorfahren aus der Klasse der CPD Photolyasen zurückgehen (Öztürk et al., 2008; Chaves et al., 2011). Strukturell stehen die DASH-Cryptochrome den Photolyasen näher als den Cryptochromen, da die für Cryptochrome typischen C-terminale Signaldomäne häufig nicht vorhanden ist und neben FAD MTHF als zweiter Kofaktor gebunden wird.

Die genaue Funktion der DASH-Cryptochrome ist bis heute noch nicht endgültig geklärt. Die mögliche Funktion der DASH-Cryptochrome als DNA/RNA Reparaturprotein wurde in vielen spezieübergreifenden Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass DASH-Cryptochrome *in vitro* in der Lage sind, CPD Läsionen in ssDNA oder loop-Strukturen zu binden und zu reparieren (Selby and Sancar, 2006; Pokorný et al., 2008). Die Reparatur von CPD-Schäden in Duplex-DNA jedoch konnte nicht zufriedenstellend nachgewiesen werden (Daiyasu et al., 2004; Froehlich et al., 2010; Kleine et al., 2003). So wird heute angenommen, dass es sich bei den ssDNA-Reparatureigenschaften von DASH-Cryptochromen eher um ein Relikt eines Vorfahren aus dieser Proteinklasse handelt und dass diese ursprüngliche Funktion sich im Verlauf der Evolution immer stärker in Richtung einer Funktion als Photorezeptor entwickelt hat (Castrillo et al., 2013; Pokorný et al., 2008; Veluchamy and Rollins, 2008).

Eine interessante Rolle kommt in diesem Kontext dem DASH-Cryptochrom cryA aus *Phycomyces blakesleeanus* zu. CryA repariert *in vitro* CPDs dsDNA mit vergleichbarer Effizienz wie ssDNA. Auch eine Photolyaseaktivität konnte *in vivo* in Komplementationsversuchen mit Photolyase-defizienten *E. coli* Stämmen gezeigt werden. Hier wurde nach der Bestrahlung die Überlebensrate bestimmt. Es konnte gezeigt werden,

dass der Verlust der Photolyase vollständig durch Einbringen von cryA kompensiert werden konnte.

Diese Erkenntnisse könnten entweder dafür sprechen, dass es sich bei cryA um einen sehr ursprünglichen Vertreter der DASH-Cryptochrome handelt oder, dass cryA in der evolutionären Entwicklung der DASH-Cryptochrome eine Schlüsselrolle zukommt. Denkbar wäre auch, dass cryA die Reparaturaktivität für dsDNA wiedergewonnen hat (Tagua et al., 2015).

#### **1.4.4.3 Cryptochrome**

##### Cryptochrome in tierischen Organismen

Als erste Photolyase-Homologe in tierischen Organismen wurden 1996 im Menschen zwei homologe Proteine gefunden und beschrieben. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu pflanzlichen Cryptochromen und dem Fehlen der DNA-Reparaturfunktion wurden diese als hCry1 und hCry2 bezeichnet (Hsu et al., 1996).

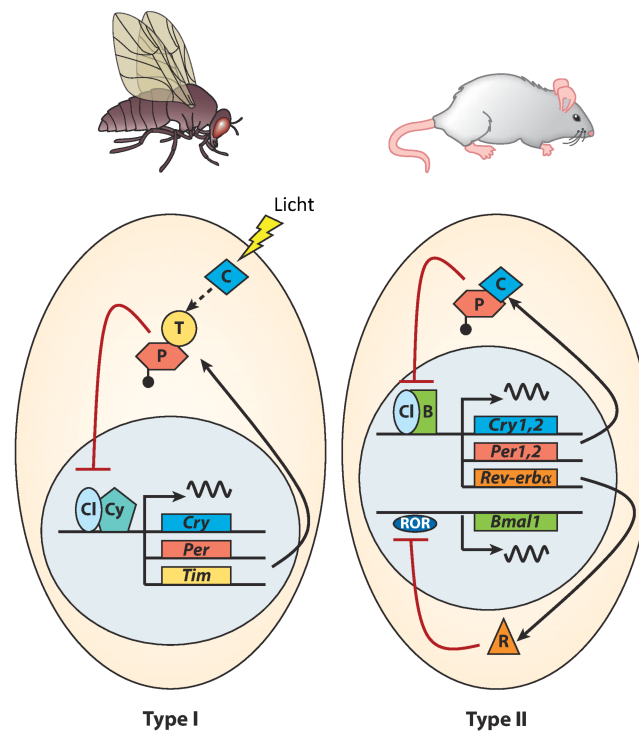
Tierische Cryptochrome werden abhängig von ihrer biologischen Funktion und der Lichtabhängigkeit in zwei Subgruppen unterteilt: Tierische Cryptochrome vom Typ I wurden bislang ausschließlich in Insekten wie *Drosophila melanogaster* beschrieben und fungieren hier als lichtabhängige Taktgeber der inneren Uhr. Tierische Cryptochrome vom Typ II hingegen wurden vorwiegend in Vertebraten beschrieben, wo sie als lichtunabhängige Repressoren der Transkription in *feedback-loops* der inneren Uhr fungieren (Ritz et al., 2010). Dabei übernimmt die C-terminale Extension eine Schlüsselrolle in der Funktion als Signal-output Domäne. Neben ihrer Funktion als Signalkomponenten der inneren Uhr dienen tierische Cryptochrome möglicherweise als Magnetorezeptoren bei *D. melanogaster* (Ritz et al., 2010).

##### Funktion als Komponenten der circadianen Uhr

Das am besten charakterisierte Typ-I-Cryptochrom ist dCry aus *D. melanogaster*. Dabei ist dCry an der Synchronisation der Inneren Uhr beteiligt, indem es lichtabhängig mit den Transkriptionsrepressoren *period* (PER) und *timeless* (TIM) interagiert. Die

Transkriptionsrepressoren PER und TIM bilden im Cytoplasma einen Komplex, der im Zellkern die beiden Transkriptionsaktivatoren CLOCK und CYCLE reprimiert. CLOCK und CYCLE aktivieren sowohl die Transkription der beiden E-Box-element-enthaltenden Gene PER und TIM, als auch die Transkription von dCRY. Im Cytoplasma kann dCry lichtabhängig mit dem PER/TIM-Komplex interagieren. Dies führt dazu, dass TIM abgebaut wird. Somit wird die Repression der Transkription der CLOCK/CYCLE-gesteuerten Gene PER, TIM und dCry durch den PER/TIM-Komplex aufgehoben (Stanewsky, 2002; Chaves et al., 2011) (siehe Abb. 12).

Ähnlich wie bei *D. melanogaster* ist auch der Oszillator der endogenen Rhythmik bei Säugetier-Cryptochromen vom Typ II aus untereinander verbundene Transkriptions- und Translationsrückkopplungsschleifen zusammengesetzt. Bei *Mus musculus* beispielsweise bilden die Transkriptionsaktivatoren CLOCK und BMAL einen heterodimeren Komplex, durch den die Aktivität E-box-enthaltender Promotoren von Oszillatorgenen, darunter auch drei PER-Gene, sowie die Gene CRY1 und CRY2, reguliert wird.



**Abb. 12 Vereinfachte Darstellung der molekularen Oszillatormodelle von Typ I und Typ II Cryptochromen.** Rote Linien stehen für Inhibitoren, schwarze gestrichelte Pfeile zeigen lichtinduzierten Abbau von TIM durch Interaktion mit Cryptochrom. Abkürzungen: C, Cryptochrom; P, Period (PER); T Timeless (TIM); Cl, clock; B, Bmal1; Cy, cycle. Veränderte Abbildung nach (Chaves et al., 2011).

Zusammen mit PER1 und PER2 fungieren die Cryptochrome vom Typ II als starke Repressoren der CLOCK- und BMAL-vermittelten Transkription und reprimieren somit unter anderem auch ihre eigene Transkription.

Des Weiteren werden die Stabilität und die subzelluläre Lokalisation der Oszillatorproteine des Transkriptions- und Translationsapparates durch fein abgestimmte posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung, Acetylierung und Phosphorylierung reguliert

Ein Beispiel hierfür bildet das freie Per2 Protein, das über den Zellkern und das Cytoplasma gleichermaßen verteilt ist und nach Phosphorylierung und Ubiquitinylierung abgebaut wird. Durch Interaktion mit den Cryptochromen wird die gleichmäßige intrazelluläre Verteilung in eine Verteilung hin zu Kernlokalisierung verschoben und Per2 kann akkumulieren.

### Magnetoperzeption durch Cryptochrome

Bei der Untersuchung der Navigation von Zugvögeln am Erdmagnetfeld wurde beobachtet, dass Blaulicht für die Orientierung der Vögel notwendig ist (Wiltschko and Wiltschko, 2002). Darüberhinaus wird zur Wahrnehmung von Magnetfeldern durch magneto-sensitive Tiere ein Radikalpaar-Mechanismus postuliert, dessen Lebensdauer idealerweise im Millisekundenbereich liegen sollte. Diese beiden Anforderungen werden ebenfalls durch Cryptochrome erfüllt. Durch Absorption von Blaulicht werden Radikalpaare gebildet, deren mittlere Lebensdauer im Bereich von mehreren Millisekunden liegt (Ritz et al., 2010; Giovani et al., 2003; Liedvogel et al., 2007). Durch experimentelle Studien konnte gezeigt werden, dass Cryptochrome tatsächlich in der Lage sind, Magnetfelder blaulichtabhängig zu perzipieren. Beispiele hierfür sind der Verlust der Wahrnehmung von extern angelegten Magnetfeldern in *cry*-Mutanten von *D. melanogaster* (Gegear et al., 2008), die Verschiebung der inneren Uhr durch das Anlegen von externen Magnetfeldern in *D. melanogaster* (Yoshii et al., 2009), sowie die verstärkte Hemmung des Hypokotylwachstums bei *A. thaliana* Keimlingen bei Blaubelichtung in Anwesenheit eines künstlich erzeugten Magnetfeldes (Harris et al., 2009). Die Ergebnisse der letzteren Studie von Harris et al. konnten bisher nicht reproduziert werden, weswegen die Beteiligung von pflanzlichen Cryptochromen an der Perzeption von Magnetfeldern umstritten ist.



## Pflanzliche Cryptochrome

### *Cryptochrom 1 und Cryptochrom 2 aus Arabidopsis thaliana*

Der Begriff „Cryptochrom“ wurde 1979 erstmals als Bezeichnung für einen postulierten Blaulichtrezeptor eingeführt (Gressel, 1979). Kurze Zeit darauf wurde mit der *hy4*-Mutante in *A. thaliana* eine Mutante beschrieben, die bei Blaubelichtung etioliert blieb, unter Rotlicht jedoch ein normales De-Etiolement zeigte (Koornneef et al., 1980). Erst 1993 wurde durch Screens von T-DNA-Linien eine Mutante gefunden, die den gleichen Phänotyp aufwies, wie die *hy4*-Mutante (Ahmad and Cashmore, 1993). Das dem HY4-Locus entsprechende Gen wurde identifiziert und wurde als CRY1-Gen bezeichnet. Kurze Zeit vorher wurde in *Sinapis alba* ebenfalls ein Cryptochrom beschrieben (Batschauer, 1993). Sequenzanalysen des CRY1-Gens zeigten starke Homologien zu bakteriellen Photolyasen und einige Jahre später wurde ein weiteres Cryptochrom (*cry2*) in *A. thaliana* identifiziert (Hoffman et al., 1996).

### Expression und Lokalisation

Im Modelorganismus *A. thaliana* werden sowohl CRY1 als auch CRY2 lichtunabhängig in nahezu allen Organen exprimiert (Ahmad and Cashmore, 1993; Lin et al., 1996). Die Transkription wird circadian kontrolliert und weist eine Oszillation der Transkriptmengen für *cry1* und *cry2* auf, wobei das Maximum von *cry1* am Morgen, das Maximum von *cry2* am Abend erreicht wird (Harmer et al., 2000). Während die Stabilität von *cry1* auf Proteinebene durch Licht nicht beeinflusst ist (Lin et al., 1996), wird *cry2* abhängig von der Fluenzrate im Blaulicht rasch abgebaut (Ahmad et al., 1998a; Lin et al., 1998).

Während *cry2* konstitutiv im Zellkern lokalisiert ist, befindet sich *cry1* sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern (Cashmore, 1999), wobei im Fall von *cry2* in der C-terminalen Extension eine Kernlokalisationssequenz nachgewiesen wurde (Kleiner et al., 1999; Guo et al., 1999). Bei *cry1* konnte jedoch keine eindeutige Kernimportsequenz gefunden werden. Während *cry1* lichtabhängig aus dem Kern in das Zytoplasma exportiert wird, verbleibt *cry2* im Zellkern (Yu et al., 2007).

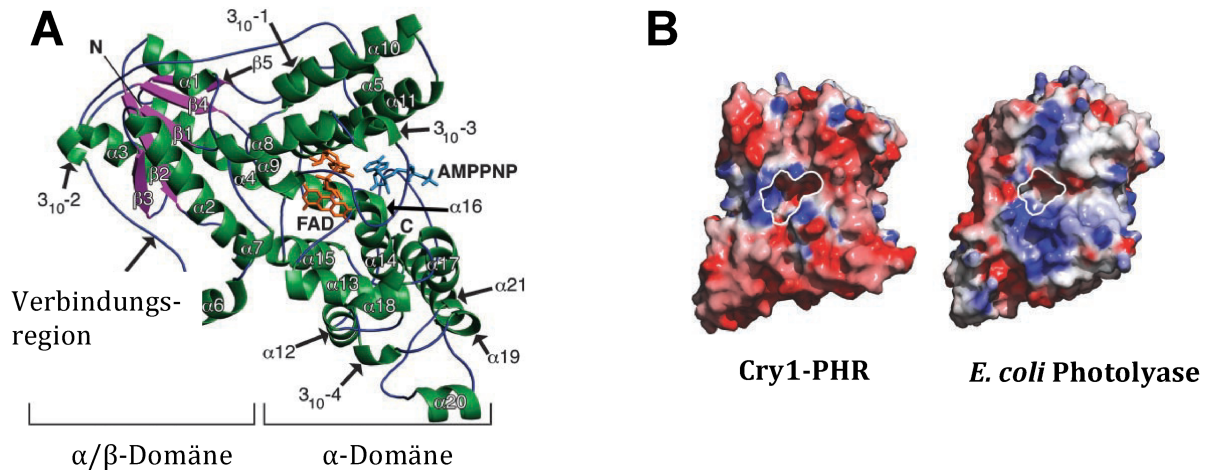
### Struktureller Aufbau

Sowohl Cryptochrom 1 als auch Cryptochrom 2 bilden jeweils Homodimere. Diese Dimerisierung ist essentiell für deren Funktionalität (Rosenfeldt et al., 2008; Sang et al., 2005). Cryptochrome sind grundlegend aus zwei Domänen aufgebaut: Einer N-terminalen Domäne, die auch als *Photolyase Homologous Region*- (PHR) Domäne bezeichnet wird, den Kofaktor FAD nicht-kovalent bindet und für die Dimerisierung verantwortlich ist (Sang et al., 2005), und einer C-terminalen Extension (CCE), die als Signalausgangsdomäne fungiert und deren Vorkommen die Cryptochrome von den Photolyasen und den DASH-Cryptochromen unterscheidet. Ob als zweiter Kofaktor MTHF gebunden ist, wird immernoch diskutiert. Im Gegensatz zu cry2 konnte die Kristallstruktur der PHR-Domäne von cry1 gelöst werden (Brautigam et al., 2004).

#### *Aufbau der PHR-Domäne*

Die Kristallstruktur der PHR-Domäne von cry1 ergab, dass die PHR-Domäne aus zwei Subdomänen zusammengesetzt ist: der N-terminalen  $\alpha/\beta$ -Subdomäne (AS 13-139) und einer C-terminalen  $\alpha$ -Domäne (AS 217-495). Die  $\alpha/\beta$ -Subdomäne nimmt eine Faltung an, die das binden von Dinukleotiden wie ATP ermöglicht. Sie besteht aus 5 parallelen  $\beta$ -Faltblättern die wiederum von 4  $\alpha$ -Helices und einer  $3_{10}$ -Helix umgeben sind. Die C-terminale  $\alpha$ -Subdomäne umfasst 14  $\alpha$ - und zwei  $3_{10}$ -Helices und bindet den Kofaktor FAD. Beide N-terminalen Subdomänen sind über eine wenig strukturierte, 77 AS (AS 140-216) lange Verbindungsregion miteinander verbunden. In der Kristallstruktur wurde eine Cystein-Brücke (Cys190) zwischen dieser Verbindungsregion und Cystein 80 der  $\alpha/\beta$ -Domäne festgestellt. Ob diese Disulfidbrücke auch *in vivo* vorhanden ist, ist jedoch unklar (Brautigam et al., 2004) (siehe Abb. 13 A).

Der FAD-Kofaktor ist in einer für die Photolyase/Cryptochrom-Proteinfamilie typischen, U-förmigen Konformation nicht-kovalent gebunden. Ein zweiter Kofaktor wie beispielsweise das in vorangegangenen Studien gefundene MTHF (Malhotra et al., 1995) konnten in der Kristallstruktur nicht nachgewiesen werden. An der Oberfläche der PHR von cry1 befindet sich eine Aushöhlung die von der Oberfläche bis ins Innere des Proteins reicht. Den Boden dieser Tasche bildet der Kofaktor FAD. Bei Photolyasen wird in dieser Aushöhlung das beschädigte DNA-Substrat gebunden (Park et al., 1995). In cry1 wird eine Seite dieser



**Abb. 13. Domänenstruktur von Cry1-PHR.** (A) Darstellung der zwei Hauptdomänen von Cry1-PHR; die  $\alpha/\beta$ -Domäne mit alpha Helices und  $\beta$ -Faltblatt und die aus  $\alpha$ -Helices bestehende  $\alpha$ -Domäne. Verbunden sind beide Domänen über eine wenig strukturierte Verbindungsregion. Im Inneren sind der Kofaktor FAD (orange) und das gebundene AMP-PNP (blau) zu sehen. (B) Vergleich der Oberflächenladung von Cry1-PHR und der *E. coli* Photolyase. Negative Ladungen sind in rot, positive Ladungen in blau dargestellt. Veränderte Abbildung nach (Brautigam et al., 2004).

Aushöhlung von vermehrt hydrophoben Aminosäureresten flankiert, wohingegen die andere Seite überwiegend mit positiv geladenen und polaren Aminosäuren besetzt ist (siehe Abb. 13 B).

#### Die C-terminale Extension der Cryptochrome

Die zweite Hauptdomäne der Cryptochrome bildet die C-terminale Extension (CCE). Sie ist im Gegensatz zur PHR-Domäne kaum strukturiert und variiert in Länge und Sequenz stark bei verschiedenen Vertretern der Cryptochrome. Zum Beispiel beträgt die Homologie der CCE von cry1 und cry2 aus *A. thaliana* lediglich 15%, wo hingegen deren PHR-Domänen zu 58% Homologie aufweisen. Trotz dieser geringen strukturellen Gemeinsamkeiten in der C-terminalen Domäne besitzen alle pflanzlichen Cryptochrome das sogenannte DAS-Motiv, welches aus der Sequenz DQXVP, einem 3-5 AS langen, aziden Teilstück aus Asp und Glu und der Sequenz STAES zusammengesetzt ist. Komplementationsversuche der *A. thaliana* hy4-9 Mutantenlinie mit cry1, welches Mutationen im DAS-Motiv aufwies, führten zu nahezu kompletten Signalverlust.

Die Expression von CCE-GUS-Fusionen in transgenen Pflanzen führte zu einem *cop*-Phänotyp, woraus man ableitete, dass die C-terminale Extension eine Schlüsselrolle in der Signalweiterleitung übernimmt (Yang et al., 2000). Eine Vielzahl von Interaktionen mit Signalpartnern werden direkt durch die CCE vermittelt (Wang et al., 2001; Yang et al., 2001;

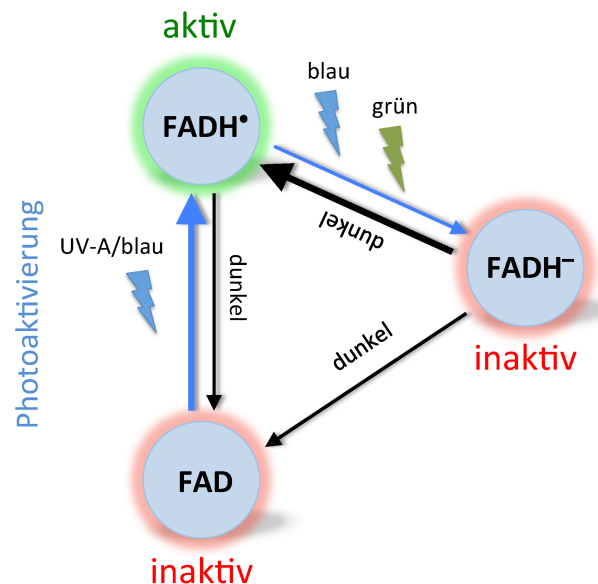
Liu et al., 2011a; Lian et al., 2011; Wang et al., 2018) Das aktuelle Modell zum molekularen Signalmechanismus besagt, dass im Dunkel die CCE-Domäne an die PHR-Domäne heranklappt. Bei Belichtung ändert die CCE ihre Konformation, löst sich von der PHR-Domäne und kann so mit Signalpartnern interagieren. Dieses Modell wird durch Studien unterstützt, in denen jeweils dunkeladaptiertes cry1- und belichtetes cry1-Volllängenprotein mit Trypsin behandelt wurden. Die CCE des belichteten Volllängenproteins wurde im Gegensatz zur CCE des unbelichteten Proteins zu einem höheren Grad durch Trypsin abgebaut. Dies lässt auf eine kompaktere Konformation des dunkeladaptierten Volllängenproteins schließen, die sich bei Belichtung öffnet und daher für Trypsin besser zugänglich ist (Partch et al., 2005; Kondoh et al., 2011).

#### Aktivierung, Photoreduktion, Oligomerisierung und Photozyklus

Damit pflanzliche Cryptochrome als Signalgeber/Signalweiterleiter mit in der Signalkaskade nachgeschalteten Molekülen interagieren können, müssen sie zuerst in einen aktiven Zustand versetzt werden. Der initiale Schritt hierbei ist die Photoreduktion des FAD durch Absorption von Blaulicht, wodurch der signalaktive Zustand (*lit state*) erreicht wird. Nach Erreichen des *lit state* folgt eine Oligomerisierung, die über die PHR-Domäne vermittelt wird. Sie ist Voraussetzung für die Funktionalität der Photorezeptoren und ist unter pflanzlichen und tierischen Cryptochromen konserviert. Die Kinetik der Oligomerisierung hat einen Einfluss auf die Photoreaktivität der Cryptochrome: Die lichtabhängige Oligomerisierung von cry1 aus *A. thaliana* benötigt beispielsweise mit etwa 1,5 min 6-8 Mal soviel Zeit wie die Oligomerisierung von *A. thaliana* cry2. Im Falle von cry2 konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung, und somit auch alle nachfolgenden Schritte, durch BIC2 (*blue-light inhibitors of cryptochromes*) reguliert wird. Neben der Bildung von Homooligomeren wurde auch die Bildung von cry1-cry2 Heterooligomeren beschrieben. Es wird vermutet, dass diese Heterooligomerisierung zur Regulierung der Aktivität der Cryptochrome beiträgt (Liu et al., 2020). Nach der Photooligomerisierung folgt eine Änderungen der Proteinkonformation und anschließende Phosphorylierung. Das so aktivierte Cryptochrom kann nun mit Signalpartnern interagieren und durchläuft währenddessen einen Photozyklus und kehrt schließlich in den Grundzustand zurück. Im Dunkel Zerfallen die Oligomere und liegen wieder als Monomere vor.

Für pflanzliche Cryptochrome konnte gezeigt werden, dass der im Dunkeln vorliegende Grundzustand das oxidierte FAD ist (Bouly et al., 2007b; Banerjee et al., 2007). Der primäre Aktivierungsmechanismus im Photozyklus der Cryptochrome ist die Photoreduktion des oxidierten FAD durch Absorption von Blaulicht. Dadurch kommt es zur Akkumulation von  $\text{FADH}^\bullet$ , dem signalaktiven Zustand der pflanzlichen Cryptochrome. Die anionische Radikalform des FAD,  $\text{FAD}^{\bullet-}$  wird hierbei nur als kurzlebige Zwischenstufe gebildet. Durch weitere Belichtung mit Blau- oder Grünlicht wird  $\text{FADH}^\bullet$  weiter zu  $\text{FADH}^-$  reduziert, wodurch der signalaktive Zustand inaktiviert wird. Im Dunkeln oxidieren  $\text{FADH}^\bullet$  und  $\text{FADH}^-$  im Verlauf weniger Minuten, wodurch wieder der Grundzustand, das oxidierte FAD akkumuliert. Es ist wichtig, anzumerken, dass der Photozyklus auch unter Dauerbelichtung nicht nur in Richtung des  $\text{FADH}^-$  verläuft. Vielmehr stellt sich fluenzratenabhängig ein Fließgleichgewicht zwischen allen Zuständen ein (siehe hierzu Abb. 14)

Der Photozyklus der pflanzlichen Cryptochrome konnte sowohl spektroskopisch als auch physiologisch nachgewiesen werden. So korreliert beispielsweise das Aktionsspektrum der Cryptochrome *in planta* mit dem Absorptionsspektrum des oxidierten FAD (siehe Abb. 8 B). Durch spektroskopische Untersuchungen an rekombinant exprimierten Holoproteinen konnten diese *in vivo* Daten bestätigt werden.



**Abb. 14. Photozyklus der pflanzlichen Cryptochrome.** Modell zur Photoreduktion von pflanzlichen Cryptochromen in dem durch Blaubelichtung das inaktive  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  in den aktiven Zustand  $\text{FADH}^\bullet$  überführt wird (Photoaktivierung). Durch Belichtung mit Grünlicht und Blaulicht wird die wiederum inaktive vollständig reduzierte Form  $\text{FADH}^-$  gebildet. Durch Inkubation im Dunkeln kommt es zu einer Rückreaktion zum  $\text{FAD}_{\text{ox}}$ . *Veränderte Abbildung nach* (Bouly et al., 2007a)

Hierzu machte man es sich zu nutze, dass sich der Photozyklus *in vitro* spektroskopisch verfolgen lässt. So wurde gezeigt, dass im Dunkeln das FAD in seiner oxidierten Form vorliegt. Während Belichtung mit Blaulicht nimmt die Absorption des oxidierten FAD ab und es wird eine metastabile Form des FAD gebildet, die im Spektralbereich über 550 nm absorbiert. Beim Vergleich mit den Referenzspektren des FAD wird klar, dass es sich bei der gebildeten Spezies einzig um  $\text{FADH}^\square$  handeln kann, da dies die einzige Redoxform ist, die in diesem Wellenlängenbereich absorbiert (vgl. hierzu Abb. 8 B). Diese Schlussfolgerung konnte in nachfolgenden EPR-Experimenten an Cry-überexprimierenden Insektenzellen *in vivo* bestätigt werden, da auch hier die Bildung von  $\text{FADH}^\square$  unter Blaubelichtung der Zellen verfolgt werden konnte.

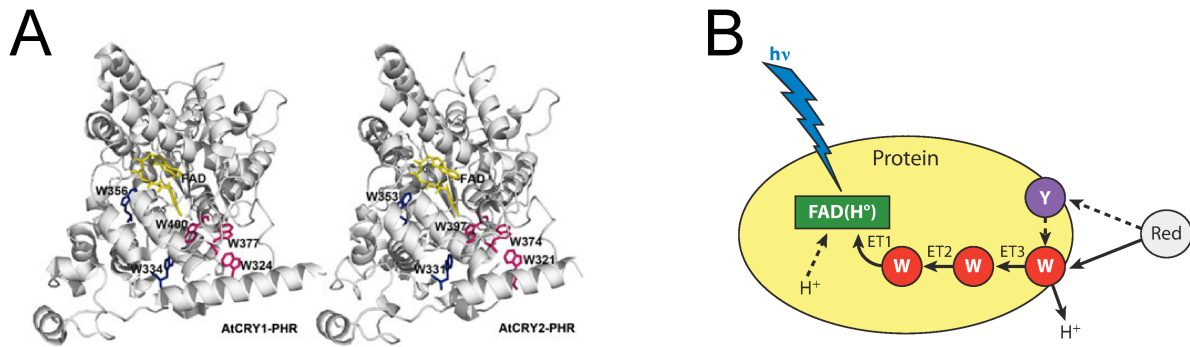
Die Lebensdauer der signalaktiven Zustände von cry1 und cry2 wurde sowohl *in planta* als auch *in vitro* gemessen: Für cry1 wurde die Lebensdauer des *lit states in planta* mit 5 min und *in vitro* mit 3-4 min bestimmt. Die Lebensdauer des *lit state* (siehe Abb. 14) von cry2 betrug *in vitro* 3-4 min und *in planta* 16 min. In dieser Zeit ist es noch möglich, durch gleichzeitige oder unmittelbar nachfolgende Grünlichtbestrahlung einen Großteil der signalaktiven cry-Moleküle in einen inaktiven Zustand zu überführen (siehe Abb. 14), was zu einer Verminderung der durch Blaulicht zu vermittelnden Antwort führt. Dieser antagonistische Effekt von Grünlicht auf blaulichtvermittelte physiologische Antworten wurde in verschiedenen experimentellen Studien beobachtet. So zeigten bichromatisch (blau/grün) belichtete Keimlinge längere Hypokotyle, als bei monochromatischer Blaubelichtung. Bei der gleichzeitigen Bestrahlung mit Grünlicht und Weißlicht zeigte sich ein ähnlicher Effekt (Zhang and Folta, 2012). Es ist denkbar, dass diese antagonistischen Effekte von Grün- und Blaulicht zur Adaption und Optimierung des Wachstums der Pflanze unter einem Blätterdach dient. Aufgrund der Grünlücke des Chlorophylls wird das Lichtspektrum durch benachbarte Pflanzen mit Grünlicht angereichert. In einer Konkurrenzsituation um bestmögliche Wachstumsbedingungen kann es für die Pflanze überlebenswichtig sein, die blaulichtvermittelte Inhibierung des Hypokotylwachstums durch Absorption von Grünlicht zu inaktivieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Reaktionen auf limitiertes Blaulicht durch direkte Interaktion von cry1 und cry2 mit den Transkriptionsfaktoren PIF4 und PIF5 gesteuert werden (Pedmale et al., 2016)

Die Bildung von  $\text{FADH}^-$  konnte bisher aber *in planta* nicht direkt nachgewiesen werden. Ein wahrscheinlicher Grund hierfür könnte die Kurzlebigkeit von  $\text{FADH}^-$  sein. Jedoch zeigten *in vitro* Belichtungsstudien mit cry1, dass die Oxidation von  $\text{FADH}^\bullet$  zu  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  durch vorherige Applikation von Grünlichtpulsen verlangsamt wird (Bouly et al., 2007a). Dies könnte indirekt

auf die Bildung von  $\text{FADH}^-$  hindeuten. Da  $\text{FADH}^*$  nicht nur im Spektralbereich  $>550\text{ nm}$  absorbiert, sondern auch eine starke Absorption im kurzwelligen Bereich des Lichtes aufweist, ist es wahrscheinlich, dass schon bei Blaubelichtung ein Photoäquilibrium zwischen  $\text{FADH}^*$  und  $\text{FADH}^-$  eingestellt wird, welches bei gleichzeitiger Belichtung mit Grünlicht stärker auf die Seite des  $\text{FADH}^-$  verschoben wird (siehe Abb. 14).

#### *Intramolekularer Elektronentransport und Trp-Triade*

Eine Reduktion des im Protein eingebetteten FAD alleine durch Gegenwart externer Reduktionsmittel ist aufgrund der Redoxpotentiale des  $\text{FAD}_{\text{ox}}/\text{FADH}^*$  Redoxpaares und des zellulären Milieus auszuschließen. Für die *E. coli* Photolyase wurde daher erstmals der Mechanismus der Reduktion durch intrinsische Tryptophane als Elektronendonoren postuliert. Dies führte einige Jahre später zum Modell der konservierten Tryptophantriade in der Photolyase/Cryptochrom Proteinfamilie (siehe Abb. 8 C und Abb. 15 A). In diesem Modell verbinden drei Tryptophane in der Funktion als Elektronentransportkette das im Inneren des Proteins eingebettete FAD mit dem das Protein umgebende zellulären Milieu. Wird der Grundzustand des FAD, das inaktive  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  durch Absorption eines Photons angeregt und geht in einen energetisch höheren Zustand über, entzieht es dem proximalen Trp ein Elektron. Das entstandene proximale Trp-Radikal entzieht nun dem medialen Trp ein Elektron und dieses dann wiederum dem distalen Tryptophan. Dieses oberflächenständige Trp-Radikal gibt ein Proton an das zelluläre Milieu ab und wird dadurch stabilisiert. Danach kann eine Elektronenaufnahme des Trp-Radikals von einem externen Elektronendonator erfolgen, wodurch wiederum das Trp-Radikal zu Tryptophan reduziert wird. Beim Elektronentransport durch die Trp-Triade kommt es folglich dreimal zu einem Elektronentransfer unter Beteiligung von Radikalzuständen. Hierbei steht jeder Transfer eines Elektrons in Konkurrenz mit der Rückreaktion, was zum Abbruch der Transportkette führt. Daher beträgt die Quantenausbeute für die Bildung des oberflächennahen Trp-Radikals etwa 20%, d.h. eines von fünf durch FAD absorbierten Photonen führt dazu, dass die Elektronentransportkette komplett durchlaufen wird. Für cry1 aus *A. thaliana* wurde die Beteiligung eines proteinoberflächennahen Tyrosins am Elektronentransfer der Trp-Triade beobachtet.



**Abb. 15. Konservierte Tryptophan-Triade in cry1 und cry2 aus *A. thaliana*.** (A) Tryptophan-Triade in den modellierten Kristallstrukturen von AtCRY1-PHR und AtCRY2-PHR. (B) Schematische Darstellung des Elektronentransportes von einem externen Reduktionsmittel (Red) über konservierte Tryptophane (W) bis zum FAD. *Veränderte Abbildung nach* (Chaves et al., 2011).

Durch Sequenzvergleiche der *E. coli* Photolyase mit den PHR-Domänen von cry1 und cry2 aus *A. thaliana* konnten die jeweiligen Tryptophane der Trp-Triade identifiziert werden (siehe Abb. 15 A). Im Falle von cry1 konnte gezeigt werden, dass der Austausch von zwei der drei Tryptophane zum Ausbleiben der Photoreduktion *in vivo* und zum Verlust der Proteinfunktion *in planta* führt (Zeugner et al., 2005). Diese Befunde stützen die Wichtigkeit der Bedeutung der Trp-Triade für die Funktion von Cryptochromen essentiellen Photoreduktion. Dem entgegen stehen Ergebnisse von Lin et al. (Gao et al., 2015), die zumindest *in vivo* eine Beteiligung der Trp-Triade bei der Photoaktivierung von Cryptochromen in Frage stellen. In dieser Studie wurden entsprechend zu Zeugner et al. (2005) im *cry1*- und *cry1cry2*-Hintergrund Cryptochrommutanten exprimiert, die jeweils an verschiedenen Positionen der Trp-Triade einen Austausch des jeweiligen Trp durch Ala/Phe trugen. Die *in vitro* ausbleibende oder stark verminderte Photoreduktion dieser Mutanten wurde analog zu Zeugner et al. (2005) ebenfalls festgestellt und in weiteren unabhängigen Studien ebenfalls nachgewiesen. Die Trp-Mutanten von *cry1* in transgenen Linien zeigten *in planta* jedoch eine zumindest partielle Komplementation des *cry1*-Hintergrundes: Bei Untersuchungen des Hypokotyllängenwachstums wurde eine blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotyls festgestellt. Lediglich eine Mutante (W400A) zeigte eine konstitutive, lichtunabhängige Aktivität.

In den *cry2*-Komplementationslinien fiel dagegen auf, dass zwei der drei Trp-Austausche zu einer Hyperaktivität des Proteins führten. Verglichen mit den jeweiligen Kontrollen wiesen die Linien mit Tryptophanaustauschen im Dunkel deutlich verkürzte Hypokotyle und unter Kurztagbedingungen ein verfrühtes Blühverhalten auf und ähnelten so einem *cop*-Phänotyp.

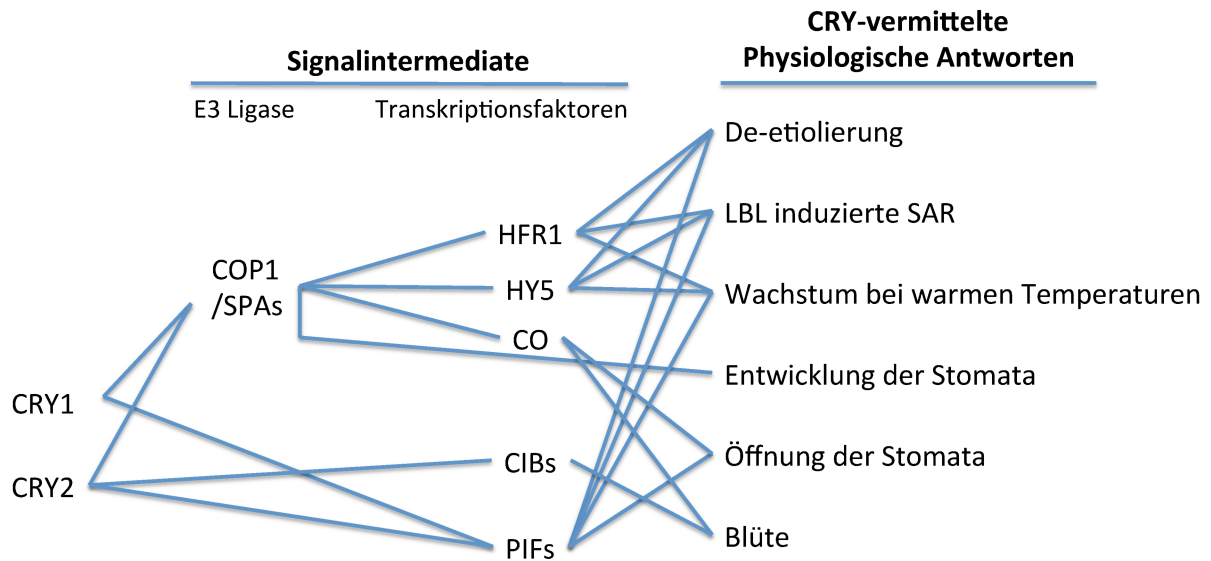


Durch diesen konstitutiv aktiven Phänotyp ist eine Auswertung der Daten hinsichtlich der Photoreduktion im Falle von *cry2* nicht möglich.

Diese Daten stellen die Notwendigkeit der Photoreduktion der Cryptochrome durch die Trp-Triade *in planta* zumindest im Falle von *cry1* in Frage (Gao et al., 2015). Es scheint also eine Diskrepanz zwischen der *in vivo*- und der *in vitro*-Rolle der Trp-Triade zu geben, die durch den Nachweis der Photoreduktion der oben erwähnten Trp-Mutanten in Insektenzellen noch vergrößert wurde. Aufgrund dieser konträren Beobachtungen kam der Begriff „Tryptophan-Triade-Paradoxon“ auf. Demnach sollen die Überreste der Tryptophan-Triade eher zur strukturellen Stabilität als zur Photoreduktion der Cryptochrome beitragen. Zur Aufklärung dieses Paradoxons sind weitere Daten nötig. Es ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass weitere konservierte Tryptophane bei Ausfall der eigentlichen Trp-Triade den Elektronentransport übernehmen.

#### Signaltransduktion und biologische Funktion von Cryptochrom 1

Pflanzliche Cryptochrome vermitteln eine Vielzahl physiologischer Antworten, indem sie blaulichtabhängig entweder direkt oder indirekt mit *downstream* Komponenten verschiedener Signalkaskaden interagieren (Liu et al., 2011b, 2016). Der Großteil dieser Interaktionen dient der Regulation von Genen auf transkriptioneller Ebene. Wichtige Interaktionspartner sind hierbei der *constitutive photomorphogenic1 / suppressor of phyA*- (COP1/SPA)-Komplex, die *cryptochrome interacting basic helix-loop-helix*- Proteine (CIB), die *phytochrome-interacting factor*- Proteine (PIF). Kürzlich wurde mit *blue-light inhibitor of cryptochromes 1* (BIC1) ein Interaktionspartner identifiziert, der mit Cryptochrom 2 interagiert um dessen Funktionen zu modifizieren (Wang et al., 2016). Neben diesen Cryptochrom-spezifischen Signalwegen (siehe Abb. 16) interagieren Cryptochrome auch direkt mit anderen Photorezeptoren wie den Phytochromen und Zeitlupe (ZTL) (Mas et al., 2000; Ahmad et al., 1998b; Jarillo et al., 2001a).



**Abb. 16. Vereinfachte Darstellung der Signalwege der pflanzlichen Cryptochrome.** Gezeigt sind die pflanzlichen Cryptochrome CRY1 und CRY2 und deren Interaktionen mit Schlüsselkomponenten in der blaulichtvermittelten Signalkaskade. Die aus den jeweiligen Signalwegen resultierenden physiologischen Antworten sind am Ende jeder Signalkette aufgeführt. *Veränderte Abbildung nach* (Yang et al., 2017).

### COP1/SPA-Signalweg

In Arabidopsis wird die E3-Ubiquitin Ligase aus COP1 und den vier Vertretern der SPA-105 Proteine (SPA1-4) gebildet (Lau and Deng, 2012). Der COP1/SPA-Komplex ist ein Repressor der Photomorphogenese. Dies wird veranschaulicht dadurch dass, wenn entweder COP1 oder zwei oder mehr SPA-Proteine deletiert werden diese Mutanten einen stark ausgeprägten *cop*-Phenotyp zeigen (vollständige De-Etiolierung auch im dauer Dunkel) (Laubinger et al., 2006, 2004).

COP1 und SPA interagieren über deren zentrale *coiled-coil* Domänen miteinander. Im Dunkel werden viele Interaktionspartner wie beispielsweise der bZIP Transkriptionsfaktor HY5 von diesem Komplex durch die C-terminale WD40-Domäne von COP1 erkannt, ubiquitinyliert und so dem Abbau durch das 26S Proteasom zugeführt, sodass die Photomorphogenese ausbleibt (Lau and Deng, 2012)(Holm et al., 2001; Yang and Wang, 2006). Bei Belichtung wird der COP1/SPA-Komplex unter anderem durch Cryptochrome inaktiviert, wodurch HY5 akkumulieren kann und die Photomorphogenese eingeleitet wird (Osterlund et al., 2000).

Das gegenwärtige Modell für Cryptochrom 1 sieht eine enge Bindung von COP1 und SPA vor, damit der COP1/SPA-Komplex seine Aktivität als E3-Ubiquitinligase ausüben kann.

Bindet nun die CCE von Cryptochrom 1 an SPA, wird die enge Bindung von SPA und COP1 gelockert und somit der COP1/SPA-Komplex inaktiviert.

Neben der oben beschriebenen Deetiolierung des Keimlings üben Cryptochrome über den COP/SPA-Signalweg unter Beteiligung des FT (*FLOWERING LOCUS T*) einen schwachen indirekten Einfluss auf das Öffnen der Stomata in Kotyledonen aus (Ando et al., 2013; Kinoshita et al., 2011). Auch konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Stomata in Kotyledonen durch CRY beeinflusst wird, da die *cry1cry2* Doppelmutante in Arabidopsis weniger Stomata aufweist, als der Wildtyp, wobei in CRY1-überexprimierenden Linien mehr Stomata zu finden sind (Kang et al., 2009). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass CRYs über die Interaktion mit dem COP1/SPA-Komplex die Aktivität des Transkriptionsfaktors HFR1 (LONG HYPOKOTYL IN FAR-RED 1), der an der LBL-*shade avoidance response* (*Low-Blue-Light*) beteiligt ist, regulieren (Pacín et al., 2016; Rolaufts et al., 2012; Pedmale et al., 2017).

#### *Interaktionen mit basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren*

Zu den mit pflanzlichen Cryptochromen interagierenden bHLH-Transkriptionsfaktoren gehören neben den CIB Proteinen auch die Vertreter der PIF-Proteinfamilie. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf Cryptochrom 1 aus *A. thaliana* liegt, wird an dieser Stelle nicht genauer auf die Interaktionen mit CIB Transkriptionsfaktoren eingegangen, da bisher keine Interaktion von Cryptochrom 1 mit CIB-Proteinen beschrieben wurde.

Wie der Name schon vermuten lässt, wurden die PIF Transkriptionsfaktoren zuerst als Phytochrom-bindende Proteine identifiziert. In *A. thaliana* sind acht PIFs (PIF1 bis PIF8) beschrieben worden. Alle acht PIFs besitzen ein *active phytochrome B binding motif* (APB). PIF1 und PIF3 verfügen neben dem APB noch über ein *active phytochrome A binding motif* (APA). PIFs fungieren als negative Regulatoren von lichtinduzierten Wachstumsprozessen, indem sie die Photomorphogenese reprimieren. Bei Belichtung werden die PIFs durch Phytochrome phosphoryliert und durch anschließende Ubiquitinylierung dem proteasomalen Abbau zugeführt, wodurch die reprimierende Wirkung aufgehoben wird und die Photomorphogenese einsetzt. Es konnte gezeigt werden, dass CRY1 in der Lage ist, lichtabhängig mit PIF4 und PIF5 zu interagieren (Pedmale et al., 2016; Ma et al., 2016).

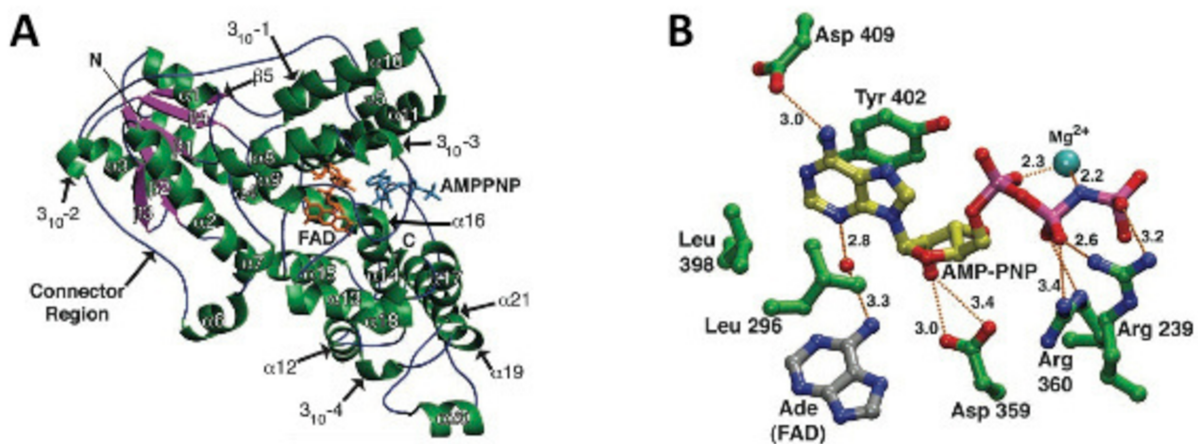
Für die Transkriptionsfaktoren PIF1 und PIF3 wurde nachgewiesen, dass sie unter Blaulicht sehr schnell abgebaut werden (Castillon et al., 2009; Bu et al., 2011). Da Phytochrome auch

im Blaubereich des Lichtspektrums Photonen absorbieren und so in den aktiven Zustand überführt werden können, ist dies nicht verwunderlich. Jedoch ist der Abbau der PIFs in *cry1cry2* Doppelmutanten beschleunigt, was nahelegt, dass die Interaktion der Cryptochrome mit den PIFs zu deren Stabilisierung beiträgt und somit dem phytochrominduzierten Abbau der PIFs entgegenwirkt (Castillon et al., 2009). Der genaue Mechanismus, wie CRYs die Stabilität der PIFs regulieren ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt.

Zu den physiologischen Antworten, die unter Beteiligung der Cryptochrome über den CRY-PIF Signalweg gesteuert werden gehört beispielsweise die unter schwachem Blaulicht ausgelöste *LBL-shade avoidance response* und die durch Blaulicht vermittelte Inhibierung der durch warme Temperaturen ausgelösten Hypokotylelongation.

### ATP-Bindung von Cryptochromen

Nachdem die blaulichtabhängige Phosphorylierung von *cry2* gezeigt wurde, konnte auch die ATP-Bindung und Autophosphorylierung von *cry1* in 2003 nachgewiesen werden (Shalitin et al., 2002; Bouly et al., 2003). Für die PHR-Domäne von *cry1* wurde die Bindung des ATP-Analogons AMP-PNP kurze Zeit später in der Kokristallstruktur gezeigt (Brautigam et al., 2004). In dieser Struktur ist der Adeninrest des AMP-PNP zwischen Tyrosin 402 und Leucin 296 im aktiven Zentrum der Einbuchtung zu finden, die in Photolyasen für die Bindung der



**Abb. 17. Bindung von AMP-PNP an Cry1-PHR.** (A) Die Struktur von Cry1-PHR. Gezeigt werden die Domänen und ihre Sekundärstrukturen:  $\alpha$ -Helices (grün),  $\beta$ -Faltblätter (lila), sowie der FAD-Kofaktor (orange) und das gebundene AMP-PNP (blau). (B) Die an der AMP-PNP beteiligten Aminosäurereste Leu296 und Tyr402 sowie der Adeninring (Ade) des FAD. Die ausgebildeten Wasserstoffbrücken sind mit gepunkteten Linien angedeutet und die Abstände der Atome sind in Ångström angegeben. Veränderte Abbildung nach (Brautigam et al., 2004).

DNA-Substrate zuständig ist. Darüberhinaus wird die Bindung des Nukleotids zusätzlich über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu polaren Aminosäuren verstärkt. Die Phosphatreste des AMP-PNP befinden sich an der Oberfläche des Proteins und sind dem umgebenden Milieu ausgesetzt. Der Flavinkofaktor hat über Wassermoleküle indirekten Kontakt mit AMP-PNP. So in Position gehalten ist der Adeninrest nur 11 Å vom Isoalloxazinring des FAD entfernt. Die ATP-Bindung konnte auch für weitere Cryptochrome nachgewiesen werden (Özgür and Sancar, 2006).

Die biologische Funktion und Relevanz der Nukleotidbindung von Cryptochromen war zu Beginn der vorliegenden Arbeit weitestgehend unklar. Aus Experimenten, die *in-vitro* oder in heterologen Systemen durchgeführt wurden, geht hervor, dass beispielsweise die Photoreduktion des FAD Kofaktors durch ATP-Bindung verstärkt wird, da FADH<sup>•</sup> stabilisiert wird (Cailliez et al., 2014; Burney et al., 2009b; Engelhard et al., 2014b). Eine Funktion als direktes Reduktionsmittel kann aber hierbei ausgeschlossen werden, da Belichtungsexperimente mit IDP (oxidierte Form des ATP) ebenfalls eine beschleunigte Photoreduktion zeigten (Engelhard et al., 2014b). Wahrscheinlicher ist, dass durch die Bindung des ATP eine lichtunabhängige Konformationsänderung im Protein induziert wird, welche die Effizienz des intramolekularen Elektronentransports steigert oder alternative Routen des Elektronentransportes zum FAD ermöglicht. Diese Konformationsänderung wurde in vorausgegangenen Arbeiten bereits gezeigt (El-Esawi et al., 2015)(Burney et al., 2009b). In der Kristallstruktur der AMP-PNP-bindenden Cry1 PHR Domäne kann jedoch keine Veränderung der Konformation im Vergleich zur nicht mit AMP-PNP besetzten PHR Domäne beobachtet werden (Brautigam et al., 2004). Ein Grund hierfür könnte jedoch darin liegen, dass die Cry1-PHR Kristalle nachträglich in AMP-PNP Lösung inkubiert wurden. Da das Kristallgitter von Cry1-PHR schon ausgebildet war, kann zwar die Anbindung des AMP-PNP erfolgen, aber es ist wahrscheinlich, dass eine Konformationsänderung aufgrund der starren Struktur nicht stattfinden kann.

Eine weitere Wirkung der Bindung von ATP könnte eine lokale Absenkung des pKa-Wertes des Aspartats D396 sein. Dieses Aspartat fungiert als Protonendonator nach Elektronenübergang auf das FAD während der Photoreduktion. Sowohl die Bindung von ATP als auch die Senkung des pH-Wertes bewirken eine Protonierung der Asparaginsäure, welche zu einer verstärkten Akkumulation von FADH<sup>•</sup> während der Photoreduktion führt (Müller et al., 2014; Cailliez et al., 2014). Gleichzeitig wurde jedoch auch bei vollständig protoniertem Asparagin noch eine steigernde Wirkung der ATP-Bindung auf die Photoreduktion festgestellt (Engelhard et al., 2014b).

Belichtungsexperimente in Insektenzellen, die Cryptochrom Mutantenproteine exprimierten, in denen Trp in der Trp Triade zu redoxinaktivem Phe ausgetauscht waren, konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von ATP die Photoreduzierbarkeit der Proteine zumindest partiell wieder herstellt (Engelhard et al., 2014b; El-Esawi et al., 2015). Durch Bindung von ATP konnte die Photoreduktion wieder erfolgen. Dies legt nahe, dass durch ATP-Bindung eine Konformationsänderung im Protein hervorgerufen wird, die alternative Routen für den intramolekularen Elektronentransport ermöglicht. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für das „Tryptophan-Triade-Paradoxon“. Basierend auf der Kristallstruktur von Cry1-PHR konnten durch Sequenzanalysen zwei weitere Tryptophane identifiziert werden (W331 & W371), die als alternative Route zum Transfer von Elektronen genutzt werden könnten (Engelhard et al., 2014b).

### **Verwendete Mutanten der PHR-Domäne von *A. thaliana* Cryptochrom 1**

Im Folgenden werden kurz die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten der PHR-Domäne mit ihren charakteristischen Eigenschaften dargestellt.

#### *cry1L407F* Mutante

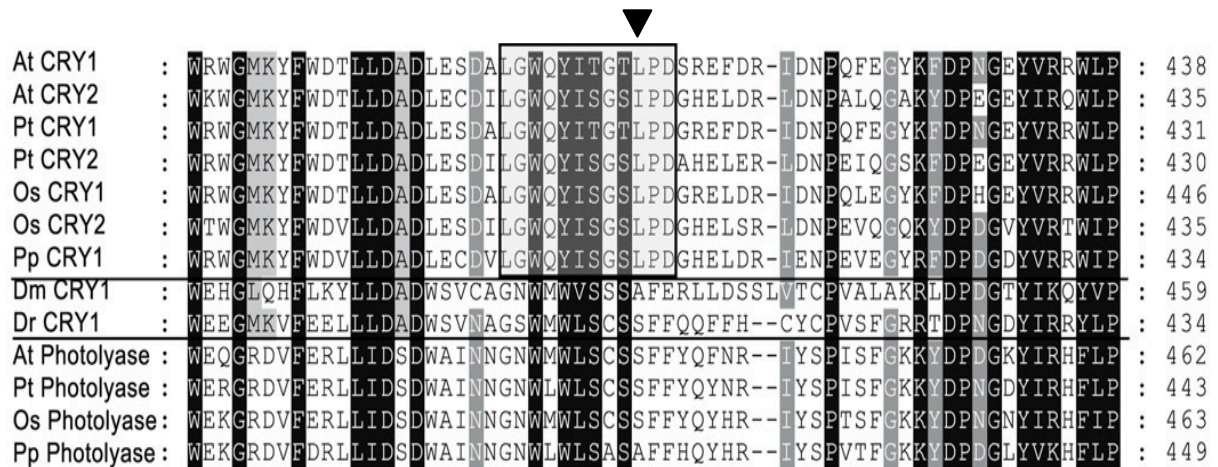
In einem *suppressor screen* wurden Pflanzen der spätblühenden transgenen Linie *msi1-tap1*, deren Samen mit Ethylmethansulfonat mutagenisiert wurden, nach frühblühenden Mutanten durchsucht. Dabei wurde von *Exner et al.* die Mutante ID0.3-457 beschrieben die eine Mutation am unteren Arm des Chromosom 5 trägt. In dieser Region ist auch das *CRY1*-Gen lokalisiert. Durch Sequenzierung des *CRY1* Locus zeigte sich auf DNA-Ebene ein C zu T Mutation, die bei Translation einen Austausch von Leu-407 zu Phe im cry1 Protein bewirkt. Sequenzanalysen zeigten, dass dieses Leu an Position 407 in nahezu allen pflanzlichen Cryptochromen stark konserviert ist. Tierische Cryptochrome besitzen an dieser Position Aminosäuren mit kleinen Seitenketten wie Alanin, Serin, Threonin oder Glycin (siehe Abb. 18).

Eine Überexpression des *CRY1L407F* Allels in Colombia Wildtypinien zeigte, dass es sich um eine *gain-of-function* Mutation handelt, da alle transgenen Pflanzen einen frühblühenden Phänotyp unter Kurztagbedingungen aufwiesen.

Die wichtigsten Physiologischen Merkmale einer Pflanze mit dem *CRY1L407F* Allel sind:

- Starke Beschleunigung der Blütenbildung unter Kurztagbedingungen

- Überexpression von *Flowering Locus T* (FT)
- Hypersensitivität gegenüber Blau- und Rotlicht



**Abb. 18. Sequenzvergleich pflanzlicher Cryptochrome, tierischer Cryptochrome und Photolyasen.** Die Abbildung zeigt das unter pflanzlichen Cryptochromen konservierte Leucin (Pfeil), welches Teil einer ebenfalls unter Pflanzlichen Cryptochromen stark konservierten Region (umrandete Aminosäuren) ist. *Abbildung aus (Exner et al., 2010)*

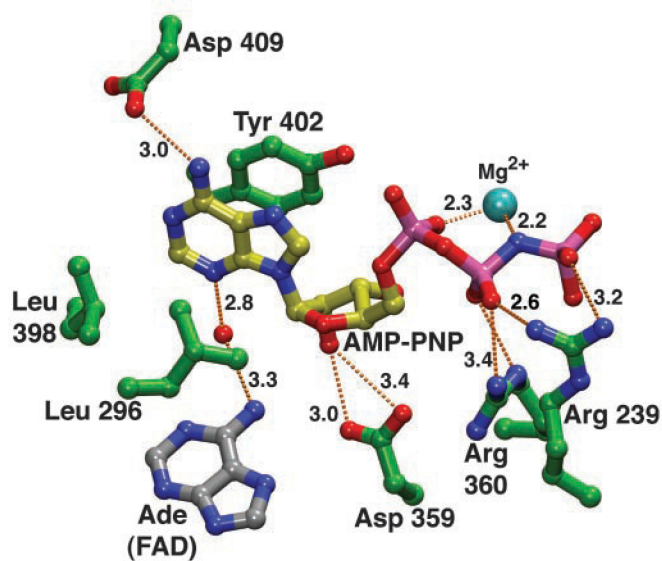
*Exner et al.* führen die Hypersensitivität gegenüber Blau- und Rotlicht anhand von Simulationen der Moleküldynamik auf eine reduzierte Flexibilität des Moleküls zurück (*Exner et al., 2010*). Weiterhin stellten *Exner et al.* die Hypothesen auf, dass durch die Mutation der Photozyklus der *cry1L407F* Mutante verändert sein könnte und dass diese Mutation möglicherweise die ATP-Bindung stabilisiert.

Im Besonderen die Hypersensitivität gegenüber Blaulicht stellt eine Eigenschaft dar die im Zuge dieser Arbeit untersucht werden sollte. Hierzu sollten zum Einen photochemische Parameter wie die Halbwertszeit des signalaktiven  $\text{FADH}^\circ$  *in-vitro* gemessen, zum Anderen biophysikalische Eigenschaften wie Schmelztemperatur bestimmt werden.

### cry1Y402A Mutante

Von Brautigam et al. wurde Anhand der Kokristallstruktur der PHR-Domäne von *A. thaliana* Cryptochrom 1 mit AMP-PNP herausgefunden, dass das Tyrosin an Position 402 essenziell für die Bindung des Metaboliten ATP ist (siehe Abb. 19).

Für die geplanten Untersuchungen dieser Arbeit war es von Vorteil, als Negativkontrolle eine Variante der *cry1* PHR herzustellen, die die Fähigkeit der ATP-Bindung verloren hat. Daher wurde das essentielle Tyrosin an Position 402 gegen ein Alanin ausgetauscht.



**Abb. 19. Ausschnitt der ATP-Bindestelle in der PHR-Domäne von *A. thaliana* Cryptochrom 1.** Der Ausschnitt zeigt das ATP-Analogon AMP-PNP, welches mit seinem Adeninring zwischen Tyrosin 402 und Leucin 296 eingepasst ist. *Abbildung aus (Brautigam et al., 2004).*



## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien entsprachen alle dem Reinheitsgrad p.A. (zur Analyse). Sie wurden hauptsächlich von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Roth (Karlsruhe) und Applichem (Darmstadt) bezogen.

### 2.2 Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung/Typ	Hersteller/Firma
Äkta Purifier		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Analysewaage	Entris 224-1S	Sartorius AG, Göttingen
Blottapparatur	Tetra Blotting Module	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
French Press	French <sup>®</sup> Pressure Cell Press	SLM AMINCO/Spectronic
Geldokumentation	DOC-Print 1000/20M + DP-CF-011.C	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Infrarot-Scanner	Odyssey <sup>®</sup> Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Interferenzfilter		Schott Glaswerke, Mainz
Kulturschüttler	Multitron pro HT	INFORS GmbH, Einsbach
Küvettenkühlung	Kryo-Thermostat WK 5	Colora Messtechnik GmbH, Lorch
Laborwaage	Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
PCR-Cycler	UNO-Thermoblock Mastercycler gradient Rotor-Gene Q	Biometra GmbH, Göttingen Eppendorf, Hamburg QIAGEN, Hilden
pH-Meter	Lab 850	Schott instruments, Mainz
Photometer	UV-2401 PC UV-VIS GeneQuant 1300 Nano Drop ND 1000	Shimadzu, Kyoto, Japan GE Healthcare, München Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettensatz	Eppendorf research	Eppendorf, Hamburg
SDS-Gelapparatur	Mini -PROTEAN <sup>®</sup> 3 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spannungs-/Stromquelle	PowerPac <sup>™</sup> HC Power 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Sterilbank	Aura H130 Faster KBN-4 Laminar Flow	Ehret Labortechnik, Emmendingen SAROSSY LABORTECHNIK, Stuttgart

Gerät	Bezeichnung/Typ	Hersteller/Firma
Tischschüttler		Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Ultraschallapparatur	Sonorex TK52	Bandelin electronic, Berlin
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, NY, USA
Wärmeschrank	Inoval 4230	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Wasserbad	Inkubationsbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge	Centrifuge 5417R Labofuge 400R Function Line J2-21	Eppendorf, Hamburg Heraeus Instruments GmbH, Hanau Beckman Coulter GmbH, Krefeld

## 2.3 Puffer und Lösungen

Lösung	Komponente	Konzentration [Endkonzentration]
10% SDS-Stammlösung	SDS	10% (w/v)
10x Lämmli-puffer (1 L)	Tris Glycin SDS A. bidest.	30.29 g [0.25 M] 144.13 g [1.92M] 10 g [1% (w/v)] add 1 L
10x PBS-Puffer, pH 7.4 (100 ml)	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 g [1.4 M bezüglich Na <sup>+</sup> ] 0.2 g [0.03 M bezüglich K <sup>+</sup> ] 1.8 g [0.1 M bezüglich Na <sup>+</sup> ] 0.24 g [0.2 M bezüglich K <sup>+</sup> ]
2x <i>E. coli</i> Lyse-Puffer	Tris-Cl, pH 8.0 NaCl Glycerin Triton X-100 Imidazole	200 mM 600 mM 20% (v/v) 1% (v/v) 20 mM
5x SDS-Probenpuffer (10 ml)	Sammelgel-Puffer DTT SDS Glycerin Bromphenolblau A. bidest.	4.5 ml [0.225 M Tris-Cl, pH 6.8] 386 mg [0.250 M] 0.5 g [5% (w/v)] 5.0 ml [50% (v/v)] 5 mg [0.05% (w/v)] add 10 ml
Amidoschwarz-Lösung	Essigsäure Methanol Amidoschwarz	10% (v/v) 90% (v/v) zugeben, bis A <sub>615</sub> einer 1:10 Verdünnung der Lösung in Waschlösung ~1.0
10% APS-Stammlösung	APS	10% (w/v)

Lösung	Komponente	Konzentration [Endkonzentration]
Blocking Puffer	TBS-Puffer	1x
	Milchpulver	3% (w/v)
Coomassie-Färbelösung	Isopropanol	25% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
	<i>coomassie-brilliant-blue</i> R-250	0.05 (w/v)
EB-Puffer	Tris-Cl, pH 8.5	10 mM
Entfärbelösung	Essigsäure	10% (v/v)
High-Imidazole Buffer	Tris-Cl, pH 8.0	100 mM
	NaCl	200 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	Imidazol	500 mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	10 mM
IPTG-Stammlösung	IPTG	1 M
Lämmli Puffer		
Lysozym-Stammlösung	Lysozym	10 mg/ml
NaOH-Lösung	NaOH	0.2 M
No-Imidazole Buffer	Tris-Cl, pH 8.0	100 mM
	NaCl	200 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol	10 mM
Sammelgel-Puffer	Tris-Cl, pH 6.8	0.5 M
SEC+10-Puffer	Tris-Cl, pH 8.0	10 mM
	NaCl	200 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol	10 mM
SEC-Puffer	Tris-Cl, pH 8.0	10 mM
	NaCl	200 mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	10 mM
TE-Puffer	Tris-Cl, pH 8.0	10 mM
	EDTA	0.1 mM
Trenngel-Puffer	Tris-Cl, pH 8.8	1.5 M
Waschlösung	Essigsäure	10% (v/v)
	Methanol	90% (v/v)
WB-Transfer-Puffer (1 L)	Tris	5.82 g [0.048 M]
	Glycine	2.93 g [0.039 M]
	10% SDS-Stocklösung	3.75 ml [0.0375% (w/v)]
	Methanol	200 ml [20% (v/v)]
	A. bidest.	add 1 L
GTE/RNase	Glucose	50 mM
	Tris-Cl, pH 8.0	25 mM
	EDTA	10 mM
	RNase	0.02 mg/ml
NaOH/SDS	NaOH	0.2 N
	SDS	1% (w/v)

Lösung	Komponente	Konzentration [Endkonzentration]
PAS-Lösung	Essigsäure KOH-Plättchen A. bidest	29.5 ml zugeben bis pH 4.8 add 100 ml
Colloidales Coomassie Stammlösung (800ml)	Lösung A: Orthophosphorsäure A. bidest Ammoniumsulfat  Lösung B: <i>coomassie brilliant blue</i> G250 A. bidest  800 ml Stammlösung: Lösung A (784 ml) + 16 ml Lösung B	16 ml 768 ml 80 g  1 g 20 ml  Gebrauchslösung frisch: 80% Stammlösung + 20% Methanol
RF1-Lösung	RbCl MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O Kaliumacetat, pH 7.5 CaCl x 2H <sub>2</sub> O Glycerin	100 mM 50 mM 30 mM 10 mM 15% (v/v)
RF2-Lösung	MOPS, pH 5.8 RbCl CaCl x 2H <sub>2</sub> O Glycerin	10 mM 10 mM 75 mM 15% (v/v)
MgCl <sub>2</sub> -Stammlösung	MgCl <sub>2</sub>	1 M
MgSO <sub>4</sub> -Stammlösung	MgSO <sub>4</sub>	1 M
dYT Medium	Bacto <sup>®</sup> Trypton Hefeextrakt NaCl	16 g/L 10 g/L 5 g/L
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix	Acrylamid Bisacrylamid	20% (v/v) 0.53% (v/v)

## 2.4 Nährmedien

Medium	Komponente	Konzentration
LB-Medium (flüssig)	Bacto <sup>™</sup> -Trypton Bacto <sup>™</sup> -Yeast Extract NaCl	10 g/L 5 g/L 5 g/L
LB-Agar	Bacto <sup>™</sup> -Trypton Bacto <sup>™</sup> -Yeast Extract NaCl Bacto <sup>™</sup> -Agar Antibiotika Petrischalen Ø 8.5 cm	10 g/L 5 g/L 5 g/L 1.5% (w/v) <i>siehe 2.5</i> 

## 2.5 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Verwendete Konzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 mg/L
Kanamycin	50 mg/ml	25 mg/L

## 2.6 Proteaseinhibitoren

Proteaseinhibitor	Stocklösung	Verwendete Konzentration
Benzamidin	200 mM	10 mM
E-64	0.8 mM	14 µM
Pepstatin A	1.5 mM in Methanol : Essigsäure (9:1)	8.8 µM
PMSF	100 mM in Ethanol	4.5 mM

## 2.7 Antikörper

Antikörper	Antigen	Quelle	Hersteller	Verdünnung
Primär αHis	His <sub>6</sub> Tag	Maus	Clontech, Mountain View, CA, USA	1:5000 in TBS-T-Puffer <sup>1</sup>
Primär αStrep-Tag <sub>2</sub>	Strep-Tag <sub>2</sub>	Kaninchen	IBA GmbH, Göttingen	1:2000 in TBS-T-Puffer <sup>1</sup>
Sekundär α mouse IR-Dye <sup>®</sup> 800cw	Maus IgG	Esel	LI-COR Biosciences, Bad Homburg	1:10 000 in TBS-T-Puffer
Sekundär α rabbit IR-Dye <sup>®</sup> 680	Kaninchen IgG	Esel	LI-COR Biosciences, Bad Homburg	1:10 000 in TBS-T-Puffer

Antikörper	Antigen	Quelle	Hersteller	Verdünnung
Sekundär $\alpha$ mouse IR-Dye <sup>®</sup> 680	Maus IgG	Esel	LI-COR Biosciences, Bad Homburg	1:10 000 in TBS-T-Puffer

<sup>1</sup>Zur längeren Haltbarkeit wurde den AK-Lösungen  $\text{NaN}_3$  in einer Endkonzentration von 0.02% zugesetzt

## 2.8 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

### 2.8.1 *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Hersteller
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA1 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Klonierung und DNA-Präparation	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
BL21[DE3]	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)	heterologe Proteinexpression	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
BL21 CodonPlus [DE3]-RIL	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>R</sup> gal (DE3) endA The [argU ileY leuW Cam <sup>R</sup> ]	heterologe Proteinexpression	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
BL21 CodonPlus [DE3]-RIL	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>R</sup> gal (DE3) endA The [argU ileY leuW Cam <sup>R</sup> ]	heterologe Proteinexpression	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

### 2.8.2 Plasmide

Plasmid	Resistenz	Verwendung	Besonderheiten (Quelle)
pET-28a(+)	Kan <sup>R</sup>	heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	T7-Promotor, 6xHis-Tag N/C-terminal (Novagen/Merk, Darmstadt)
pASK-IBA43-plus	Amp <sup>R</sup>	heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	tet-Promotor, 6xHis-Tag N-terminal, Strep-Tag II C-terminal (IBA GmbH, Göttingen)

Plasmid	Resistenz	Verwendung	Besonderheiten (Quelle)
pACYCDuet-1	Cm <sup>R</sup>	heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	T7-Promotor-1, MCS-1 mit 6xHis-Tag N-terminal; T7-Promotor-2, MCS-2 mit C-terminal S-Tag (Novagen/Merk, Darmstadt)

### 2.8.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma *MWG-Biotech* GmbH (Ebersberg) synthetisiert. Zur direkten Klonierung von PCR-Amplifikaten in den Zielvektor tragen einige Primer eine 5'-Extension von 1-5 bp (*Großbuchstaben kursiv*). Mutagenisierte Codons sind in Kleinbuchstaben angegeben.

Restriktionsschnittstellen: **EcoRI**, **NotI**

#### N-terminus (AS 1-509) von cry1 WT und cry1L407F in pACYCDuet-1

Primer forward:

5'- *TAT TTG AAT TCG* TCT GGT TCT GTA TCT GG -3'

Primer reverse:

5'- *ATT GCG GCC GCT* TAT CCT TCT TCG GAT CCG TT-3'

#### Herstellung der cry1Y402A-Mutante in pACYCDuet-1

Primer forward:

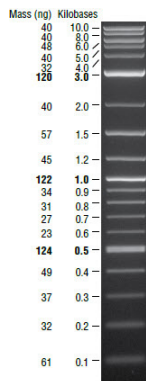
5'-C GAT GCT CTT GGT TGG CAA ggc ATT ACC GGT ACT CTC CCG G-3'

Primer reverse:

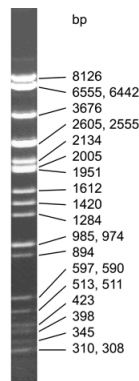
5'-C CGG GAG AGT ACC GGT AAT cgc TTG CCA ACC AAG AGC ATC G-3'

## 2.8.4 DNA-Größenmarker

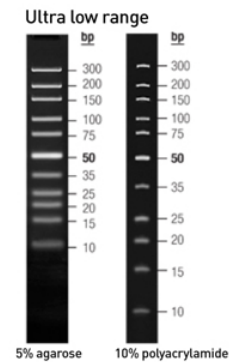
Folgende DNA-Größenmarker wurden bei der Agarose-Gelelektrophorese verwendet:



2-Log DNA Ladder 0.1-10.0 kbp  
(New England Biolabs)



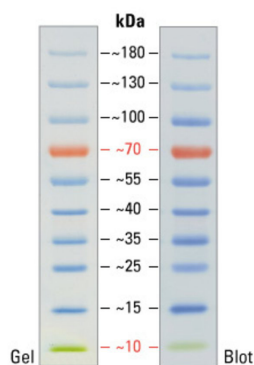
λ-DNA/EcoRI (*Ava*II) DNA-Marker  
(MBI Fermentas)



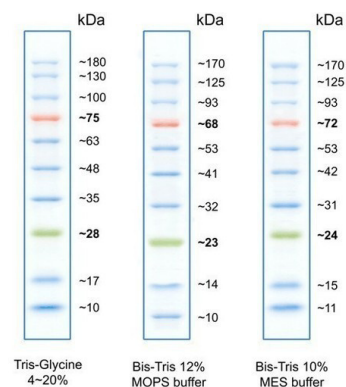
O'GeneRuler DNA Ladder  
Ultra Low Range (ThermoFisher scientific)

## 2.8.5 Protein-Größenmarker

Als Größenreferenz bei SDS-PAGE-Analysen und Western Blots wurden folgende Proteinmarker benutzt:



PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa  
(ThermoFisher scientific)



BlueStar Prestained Protein Marker 10-180 kDa  
(Nippon Genetics Europe GmbH)



## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung und Transformation von *E. coli*

##### 3.1.1.1 Kultivierung von *E. coli* auf Festmedium

Um selektive *E. coli* Einzelkulturen zu erhalten, wurden die Zellen entweder nach einer vorangegangenen Transformation oder aus einer Glycerin-Gefrierkultur auf LB-Festmedium mit entsprechenden Antibiotika ausgebracht.

Hierbei wurden im Falle einer Transformation je nach Transformationseffizienz und Volumen des Transformationsansatzes 10-150 µl des Ansatzes unter sterilen Bedingungen auf LB-Agar ausgebracht.

Bei Gefrierkulturen wurde eine sterile Impföse in die Kultur getaucht und die Zellen wurden unter Anwendung der 3-Strich-Technik auf das Festmedium übertragen, um Einzelkolonien zu erhalten.

##### 3.1.1.2 Kultivierung von *E. coli* als Flüssigkultur im analytischen Maßstab

Diese Kultivierungsmethode von *E. coli* Zellen wurde standardmäßig für Plasmidpräparationen, zur Stammhaltung als Glycerin-Gefrierkulturen oder als Inokulum für größere Kulturvolumina angewandt.

Hierbei wurden je 3 ml LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika versetzt und mit einer Zellkolonie einer Selektionsplatte unter sterilen Bedingungen angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 220 rpm über Nacht (12-16 h).

### **3.1.1.3 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen**

Zur Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurde die Rubidiumchlorid-Methode angewendet. Dafür wurden 100 ml steriles dYT-Medium mit Zellen aus einer Übernachtskultur 1:100 angeimpft und jeweils mit 1 µl MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung und MgSO<sub>4</sub>-Stammlösung versetzt. Die frische Kultur wurde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> etwa 0.6 erreichte. Dann wurden die Zellen für 30 min auf Eis gelagert und anschließend bei xxxg und 4 °C für 8 min pelletiert. Das Pellet wurde im Anschluss in 33 ml steriler RF1-Lösung resuspediert und die Suspension erneut für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut bei xxxg und 4°C für 8 min pelletiert und das Pellet in 5 ml RF2-Lösung aufgenommen. Nach weiterer 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### **3.1.1.4 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen**

Zur Transformation von *E. coli* Zellen (Hanahan, 1983) wurde pro Ansatz ein Aliquot von 100-150 µl einer Glycerin-Gefrierkultur chemisch kompetenter Zellen des zu transformierenden Stammes auf Eis aufgetaut und mit 50-100 ng Plasmid-DNA versetzt, leicht durchmischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Transformationsansätze für 1 Minute bei 42 °C einem Hitzeschock im Heizblock ausgesetzt, gefolgt von einer Kälteschockbehandlung für 2 Minuten auf Eis. Danach wurden jedem Ansatz sofort 500-900 µl antibiotikafreies, auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Zur Regeneration der Zellen und zum Aufbau der durch das Plasmid eingebrachten Antibiotikaresistenzen wurden die Transformationsansätze für 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen 10-200 µl (Abhängig von Transformationseffizienz) jedes Ansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Wärmeschränk inkubiert.

### **3.1.2 Isolation von Nukleinsäuren**

#### **3.1.2.1 Plasmid Minipräparation**

##### **3.1.2.1.1 Alkalische Lyse**

Die Plasmidpräparation durch Alkalische Lyse wurde nach der von Birnboim und Doly beschriebenen Methode durchgeführt (Birnboim and Doly, 1979).

Zur Präparation des Plasmids wurden 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation für 1 min bei 20.000 x g und RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 1 ml GTE/RNase resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS erfolgte eine Inkubation für 5 min auf Eis. Anschließend wurden 150 µl PAS-Lösung zugegeben und die Suspension erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden Zelldebris und Präzipitate durch Zentrifugation bei 20.000 x g und 10 min bei RT pelletiert und der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml 99,9 %igem Ethanol und anschließender 2 minütiger Inkubation bei RT wurde die Plasmid-DNA aus der Lösung gefällt. Die Pelletierung der Plasmid-DNA erfolgte durch erneute Zentrifugation für 5 min bei 20.000 x g und RT. Abschließend wurde die pelletierte DNA nochmals mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei RT getrocknet und anschließend in 20-50 µl EB aufgenommen.

### **3.1.3 Manipulation von DNA**

#### **3.1.3.1 Durchführung einer Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Die PCR ist ein molekularbiologisches Standardverfahren zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Sequenzen (Mullis et al., 1986). Eine typische PCR ist im Wesentlichen in folgende Reaktionsschritte unterteilt: Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation.

Das Prinzip beruht darauf, dass in einem Denaturierungsschritt die beiden komplementären Stränge der DNA-Matrize (Template-DNA) durch Erhitzen voneinander getrennt und Sekundärstrukturen in den Nukleotidsträngen aufgelöst werden. In der Regel wird dieser Schritt bei 95°C für 60 Sekunden durchgeführt, wobei je nach Komplexität und GC-Gehalt der verwendeten Template-DNA Anpassungen der Temperatur oder der Dauer erforderlich sein können. Während des Primer-Annealing wird die Temperatur rasch abgesenkt, um ein Anlagern der Primer an die nun als Einzelstränge vorliegende DNA-Matrize zu ermöglichen. Die Wahl der Annealing-Temperatur beeinflusst hierbei die Spezifität der Anlagerung der Primer an die Template-DNA. Eine zu niedrig gewählte Annealing-Temperatur begünstigt Basenfehlpaarungen zwischen Primer und Matrize, was zu Punktmutationen oder unerwünschten Nebenprodukten führen kann. Eine zu hoch gewählte Annealing-Temperatur führt hingegen zu einer verminderten Produktbildung oder zum Ausbleiben eines Produktes. Im Elongationsschritt wird die Temperatur rasch auf das Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase eingestellt. In diesem Schritt werden die an die Matrize angelagerten Primer durch die DNA-Polymerase entsprechend komplementär zur Matrize verlängert. Die Dauer der Elongation wird maßgeblich durch die Geschwindigkeit der verwendeten DNA-Polymerase bestimmt. Eine handelsübliche Taq DNA-Polymerase hat eine Geschwindigkeit von 1 kb pro Minute, modifizierte DNA-Polymerasen wie Phusion Polymerasen erreichen Geschwindigkeiten von 2 kb pro Minute. Durch die Länge des erwarteten Produktes und die Geschwindigkeit der DNA-Polymerase kann die Dauer des Elongationsschrittes festgelegt werden. Dieser Zyklus bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird je nach Anwendung zwischen 25 und 40 Mal wiederholt. Um die PCR-Reaktion zu optimieren, wird in der Regel einmalig eine initiale Denaturierung der DNA-Matrize bei 95°C für 2-5 Minuten durchgeführt, um sicherzustellen, dass auch komplexe DNA komplett denaturiert wird. Am Ende der PCR wird zudem häufig ein finaler Elongationsschritt angefügt. So wird sichergestellt, dass unfertige PCR-Produkte auf die korrekte Produktlänge aufgefüllt werden.

Im Folgenden ist ein typisches Programm für eine PCR-Reaktion aufgeführt:

<b>Programmabschnitt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	95 °C	2-5 min	1
Denaturierung	95 °C	60 s	
Primer-Annealing	50-65 °C	30 s	25-40
Elongation	72 °C	0,5-8 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

Die PCR-Reaktionen wurden in dünnwandigen 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt.

Reaktionskomponenten, Stocklösungen und ihre gebräuchlichen Endkonzentrationen :

<b>Komponente</b>	<b>Stammösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
Template DNA	variabel	10-100 ng
3' - Primer	10 µM	0,2 µM
5' - Primer	10 µM	0,2 µM
Reaktionspuffer	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM
dNTP Mix	je 10 mM	200 µM
<i>Taq</i> DNA Polymerase	xU/µl	1 U
Nukleasefreies Wasser	---	Auffüllen auf Reaktionsvolumen

Die oben genannten Endkonzentrationen der Komponenten stellen einen Standard PCR-Ansatz dar und müssen unter Umständen den experimentellen Anforderungen und Gegebenheiten angepasst werden.

### 3.1.3.1.1 Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR

Die sequenzspezifische Mutagenese ermöglicht den zielgerichteten Austausch eines oder mehrerer Codons in einer DNA-Sequenz *in vitro*. So können beispielsweise Punktmutationen einzelner Codons oder Deletionen bzw. Insertionen von Codons durchgeführt werden.

Grundlage der Methode ist die Synthese von komplementären Primern, die die gewünschte Mutation tragen. Durch eine PCR des Ausgangsplasmids wird die Mutation über die beabsichtigte Fehlpaarung der Primer mit der Ausgangs-DNA in die Sequenz eingebracht. Zur Entfernung des Ausgangsplasmids, das keine Mutation trägt, wird die Eigenschaft vieler Bakterien zur Dam-Methylierung ausgenutzt. Das Ausgangsplasmid wurde aus dem *E. coli*-Stamm XL1-Blue isoliert. Dieser Stamm ist Dam-Positiv. Dies bedeutet, dass die Plasmid-DNA an spezifischen Sequenzabschnitten (5'-Gm6ATC-3') methyliert bzw. hemimethyliert vorliegt. Im Anschluss an die PCR sind die Amplifikate nicht methyliert. Durch Zugabe der Endonuklease *DpnI* wird methylierte und hemimethylierte DNA spezifisch an diesen Stellen geschnitten. Nichtmethylierte DNA ist vor dem Abbau durch *DpnI* geschützt. So wird durch die Restriktion nur das methylierte Ausgangsplasmid aus dem Gemisch entfernt, die mutagenisierten Amplifikate verbleiben und werden zur Transformation von kompetenten XL1-Blue Zellen verwendet. Die Replikation der Amplifikate in den Bakterienzellen führt sowohl zur Reparatur des durch die PCR entstandenen Strangbruchs, als auch zur Vermehrung der mutagenisierten DNA.

Die sequenzspezifische Mutagenese wurde mit dem *QuickChange II site directed mutagenesis Kit* der Firma *Agilent Technologies* nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer mit der einzubringenden Mutation wurden nach Empfehlung des Herstellers entworfen. Für die PCR-Amplifikation wurde die *PfuUltra™ High-Fidelity (HF)* DNA-Polymerase mit *Proofreading*-Aktivität eingesetzt. Diese Polymerase verfügt nach Herstellerangaben über eine 18fach höhere Genauigkeit bei der DNA-Synthese als die *Taq*-DNA-Polymerase (Fehlerwahrscheinlichkeit *PfuUltra™ HF* Polymerase =  $4,3 \times 10^{-7}$  Mutationen/Base/Duplikation; Fehlerwahrscheinlichkeit *Taq*-Polymerase =  $7 \times 10^{-6}$  Mutationen/Base/Duplikation). Daher wird sie für sequenzgenaue PCR-Amplifikationen vorgezogen.

Nach Kultivierung der transformierten XL1-Blue Zellen wurde die mutagenisierte Plasmid-DNA extrahiert und die Mutagenese durch eine anschließende Sequenzanalyse überprüft.

### **3.1.3.2 Restriktion von DNA**

Die Restriktion von DNA wurde zur linearisierung von Plasmidvektoren, zur Vorbereitung von Klonierungsansätzen und zur Kontrolle von Ligationen und PCRs angewendet. Eingesetzt wurden hierbei Restriktionsenzyme der Hersteller *ThermoFisher scientific* (ehemals *Fermentas*) und *New England Biolabs*.

Analytische Restriktionen von DNA wurden in einem 20 µl Reaktionsvolumen in enzymespezifischem Puffer nach Herstellerangaben angesetzt und enthielten 100-500 ng DNA und 1-3 U des entsprechenden Enzyms. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Wärmeschrank für 2-4 h.

Zur präparativen Restriktion von DNA wurden ca. 10 µg DNA in einem 50 µl Ansatz mit entsprechendem Puffer und 10-15 U Enzym versetzt und dann 2-8 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Zur anschließenden Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Ansätze je nach verwendetem Enzym für 20 min auf 65 °C oder 80 °C erwärmt.

Zur Analyse oder zur Präparation der restringierten DNA wurden die Ansätze nach Inkubation teilweise oder ganz auf ein 1-3 %-iges TBE-Agarosegel geladen und elektrophoretisch separiert (*siehe auch: 3.1.4.2*).

### **3.1.3.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Um DNA-Fragmente nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung aus Agarosegelen wiederzugewinnen, wurde das *Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen verwendet.

Hierzu wurden die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente unter einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht, die Banden der gewünschten Größe mit einem Skalpell rasch ausgeschnitten und die Gelstücke jeweils in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem das Gewicht der Agarosegelstücke festgestellt wurde, wurde die dem Gewicht entsprechende Menge Puffer nach Angaben des Herstellers hinzugefügt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers ausgeführt.

Zur Kontrolle der Reinheit wurde im Anschluss an die Gelextraktion ein Aliquot der extrahierten DNA auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt.

### **3.1.3.4 Klonierung von DNA-Fragmenten**

Zur Klonierung eines DNA-Fragmentes in einen Zielvektor wurde das DNA-Fragment zuvor durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Für die Restriktion der DNA wurden Restriktionsenzyme der Firma *New England Biolabs* verwendet und gemäß dem Anwenderprotokoll angewendet. Die für die PCR verwendeten Primer trugen als 5'-Überhang die Erkennungssequenzen für die entsprechenden Restriktionsenzyme zur gerichteten Insertion in den Vektor sowie zusätzlich eine 1-5 bp lange Extension, um die Amplifikate nach Beendigung der PCR direkt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandeln zu können (*siehe auch 2.8.3.*) Die Länge der Extension richtet sich hierbei nach dem jeweils verwendeten Enzym und kann auf der Internetseite von *New England Biolabs* eingesehen werden.

### **3.1.3.5 Ligation von DNA**

Nachdem der Zielvektor und das Insert mit entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt wurden, wurde das Insert durch Ligation in den Vektor eingebracht. Hierzu wurde die T4 DNA Ligase von *Thermo scientific* verwendet.

Für eine erfolgreiche Ligationsreaktion ist das Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA entscheidend. Nach Angaben des Herstellers kann je nach Anforderung das Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA zwischen 1:1 und 1:5 variiert werden. In den meisten Fällen wurde ein Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 oder 1:5 verwendet.

Zur Berechnung der benötigten DNA Menge des Inserts bei einer vorgegebenen Vektor-DNA Konzentration (20-100 ng) wurde folgende Formeln verwendet:

#### Verhältnis Vektor/Insert 1:3

$$\text{Insert [ng]} = (3 \times \text{Vektor [ng]} \times \text{Insert [bp]}) / \text{Vektor [bp]}$$

#### Verhältnis Vektor/Insert 1:5

$$\text{Insert [ng]} = (5 \times \text{Vektor [ng]} \times \text{Insert [bp]}) / \text{Vektor [bp]}$$



Ein typischer Ligationsansatz hatte ein Volumen von 20 µl und ist im Folgenden dargestellt:

<b>Ligation von <i>sticky ends</i></b>	
Linearisierter Vektor	20-100 ng
Insert DNA	s.o.
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
T4 DNA Ligase 5U/µl	1 U
Nukleasefreies Wasser	add 20 µl

Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT wurde der Ligationsansatz zur Transformation von kompetenten *E. coli* One Shot TOP10 Zellen verwendet werden.

### 3.1.4 Analyse von Nukleinsäuren

#### 3.1.4.1 Gehaltsbestimmung von DNA

Zur Analyse des DNA-Gehaltes einer Lösung wurde der *Nanodrop™2000* von *ThermoFisher scientific* eingesetzt. Dieses Photospektrometer bestimmt den DNA-Gehalt einer Lösung mit einem Volumen von 1-2 µl. Hierzu wird die Absorption der Probe bei 260 nm und 280 nm gemessen. Zur Berechnung der Konzentration der DNA in der Lösung wird folgende Formel verwendet:

$$A_{260} \times 50 = c_{DNA} \left[ \frac{\mu g}{ml} \right]$$

Zusätzlich wurde das Verhältnis der Absorption 260/280 nm berechnet. Dieser Quotient gibt die Reinheit der DNA an. Ein Verhältnis von 1.8 gilt hierbei als reine DNA-Lösung, ein Verhältnis  $\geq 1.6$  zeigt eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen an.

DNA-Bestimmungen auf diese Weise wurden als Triplikate durchgeführt und der Mittelwert wurde als DNA-Konzentration angenommen.

### 3.1.4.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um Nukleinsäure-Fragmente anhand ihrer Größe für analytische oder präparative Zwecke aufzutrennen. In einem Agarosegel bilden die kettenförmigen Agarosemoleküle durch Quervernetzung über Wasserstoffbrücken ein Porennetzwerk, welches die Auftrennung von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld ermöglicht. Große Fragmente wandern langsamer durch die Gelporen als kleine Fragmente. Im Vergleich mit einem definierten Marker kann entsprechend der Positionierung der Fragmente im Gel auf deren Größe geschlossen werden.

Zum Ansetzen eines Gels wurde Agarose in nicht-denaturierendem TBE-Puffer aufgekocht, mit dem interkallierenden Fluoreszenzfarbstoff Midori Green versetzt und in Gelschlitten gegossen. Danach wurde das Gel mit Gelkämmen bestückt, um Ladetaschen für die Proben auszusparen.

Das Fassungsvermögen der Ladetaschen der Gele konnten durch Kämme unterschiedlicher Zinkenanzahl und Zinkengröße an die Probenanforderungen angepasst werden. So wurden für analytische Anwendungen Taschengrößen von 20 µl Ladevolumen verwendet, wohingegen Gele für präparative Zwecke Taschen mit 50 µl Ladevolumen hatten. Nach dem Abkühlen und Aushärten des Gels konnte dies direkt verwendet werden oder zur späteren Verwendung bei 4°C für einige Tage gelagert werden.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde hauptsächlich dazu eingesetzt, um Klonierungen durch gezielte DNA-Restriktionen zu überprüfen. Je nach Größe der zu analysierenden Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 1-3% (w/v) in den Gelen verwendet. Durch die Konzentration der Agarose wurde die Trennkraft des Gels an die Fragmentgrößen angepasst. Die fertigen Gele wurden vor Verwendung in eine Laufapparatur eingesetzt und mit TBE-Puffer überschichtet. Die zu analysierenden Proben wurden mit 5x Ladepuffer versetzt, sodass der Probenpuffer 1/5 des Endvolumens der Probe ausmachte. Danach wurden die Proben mit einer Pipette vorsichtig in die Taschen geladen, wobei das im Probenpuffer enthaltene Glycerin dafür sorgte, dass die Proben rasch in die Taschen absanken. Als Referenz wurde zusätzlich ein entsprechender Größenmarker aufgetragen (*siehe 2.8.4*).

Nach dem Beladen des Gels wurde die Gelkammer geschlossen und eine Spannung von 100 V angelegt. Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel aus der Laufkammer genommen und auf den UV-Transilluminator des Geldokumentationssystems überführt. Der in Nukleinsäuren interkallierende Fluoreszenzfarbstoff Midori Green wurde durch das UV-Licht angeregt, wodurch die Nukleinsäurefragmente im Gel als fluoreszierende Banden

sichtbar wurden. Das Ergebnis der Analyse wurde fotografisch erfasst und konnte dann sowohl als digitales Bild gespeichert als auch direkt ausgedruckt werden.

### **3.1.4.3 Sequenzierung**

Die Richtigkeit von DNA-Sequenzen nach PCR-Amplifikation und Klonierung in den Zielvektor wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen wurden von der Firma *GATC Biotech* (Konstanz) durchgeführt. Die Primer für die Sequenzierung der jeweiligen Konstrukte wurden entweder aus der Primerdatenbank der Firma ausgewählt oder als Aliquots separat mit den Proben mitgeschickt.

Die Ergebnisse der jeweiligen Sequenzanalysen wurden elektronisch von *GATC Biotech* als Elektropherogramme des Sequenzierungslaufes (ABI-Files) und FASTA-Files zugesendet. Mit Hilfe der Vector-NTI<sup>®</sup> Software von Invitrogen konnten dann die Sequenzen der Sequenzierungsreaktionen mit der Erwartungssequenz verglichen werden.

## **3.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.2.1.1 Proteinexpression zur Proteinaufreinigung**

#### **Expression der PHR-Domäne (AS 2-509)**

Zur heterologen Proteinexpression in *E. coli* wurden die in Abb. 20 gezeigten Konstrukte in Expressionsvektor pACYCDuet-1 (Novagen) kloniert. Die Richtigkeit der DNA-Sequenzen wurde durch Sequenzierung der Firma GATC nachgewiesen.

Um die optimale Expressionsresultate zu erhalten, wurden Testexpressionen in LB-Medium und TB Medium bei 25°C, 30°C und 37°C durchgeführt. Ebenso wurden verschiedene *E.coli* Expressionsstämme getestet. Auch die Methode der Autoinduktion der Expression nach Studier (Studier, 2005) wurde getestet. Nach Auswertung der Daten der Testexpressionen (Daten nicht gezeigt), stellten sich folgende Bedingungen als Ideal für die heterologe Expression der cry1 PHR Domänen heraus:



**Abb. 20. Die Konstrukte der *in-vitro* untersuchten cry1 PHR Domänen.** Die Abbildung zeigt die Konstrukte der PHR Region von cry1. Es wurden die AS 2-509 von Cryptochrom 1 aus *A. thaliana* in den Expressionsvektor pACYCDuet-1 (Novagen) kloniert. Aminosäureaustausche der Mutanten sind in rot angegeben. His<sub>6</sub>, 6x Histidin-Tag am N-Terminus; PHR, Photolyase Homologous Region.

Zur Überexpression der photosensorischen Domänen im Expressionsstamm BL21(DE3) wurde eine 50 ml antibiotikahaltiges LB-Flüssigmedium mit einer Kolonie einer Transformationsplatte (siehe 3.1.1.4) inokuliert und bei 37 °C bei 220 rpm über Nacht kultiviert. Im Anschluss 6x50ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt und mit je 2 ml der Übernachtskultur angeimpft. Diese Vorkulturen wurden bei 37 °C und 220 rpm weitere 6 h inkubiert. Danach wurde mit jeder 50 ml Kultur je eine 1,5 L antibiotikahaltige Hauptkultur inokuliert. Die Kultivierung der Hauptkulturen erfolgte bei 37 °C und 140 rpm, wobei die OD<sub>600</sub> in regelmäßigen Abständen geprüft wurde. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ~0,4 wurde die Temperatur im Kulturschüttler auf die Expressionstemperatur von 25 °C herabgesetzt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei OD<sub>600</sub> ~0,6-0,8 durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach einer Expressionszeit von 12-14 h bei 25 °C wurden die Hauptkulturen ca. 30 min auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 5.000 x g und 4 °C für 25 min pelletiert und die Zellpellets in je 50 ml eisgekühlten 1x PBS-Puffer zum Waschen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon-Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C und 4.000 x g 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert.

### 3.2.2 Analytische Proteinextraktion aus *E. coli*

Zur Analyse der Expressionstärke und der Löslichkeit der rekombinanten Proteine in verschiedenen *E. coli* Expressionstämmen wurde eine analytische Proteinextraktion aus den Proben von Testexpressionen durchgeführt. Hierbei wurden sowohl Proteingesamtextrakte als auch Extrakte, die nur den löslichen Anteil der Proteinfraction enthielten, hergestellt.

### **3.2.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten im analytischen Maßstab**

Die tiefgefrorenen Zellpellets der 1 ml Aliquots wurden auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden pro Zellpellet 20 µl 5x SDS-Probenpuffer (handwarm) zugegeben und die Pellets bei RT resuspendiert. Die Proben wurden anschließend für 3 min bei 95 °C im Thermoblock aufgeköcht. Danach wurde jede Probe mit 80 µl bidestilliertem Wasser versetzt und nach Durchmischen erneut für 7 min bei 95 °C erhitzt. Abschließend wurden unlösliche Bestandteile und Zelldebris durch Zentrifugation mit 20.000 x g bei RT für 5 min in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde entweder sofort für weitere Analysen verwendet oder bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Hierbei muss beachtet werden, tiefgefrorene Proben nach dem Auftauen vor Verwendung nochmals für 1 min bei 95 °C aufzukochen, damit das im Puffer enthaltene SDS wieder in Lösung übergeht. Proben vor Verwendung erneut bei 20.000 x g und RT für 2 min zentrifugieren.

### **3.2.2.2 Herstellung von löslichen Proteinextrakten im analytischen Maßstab**

Zur Herstellung der löslichen Proteinfraction wurden tiefgefrorenen Zellpellets von 2 ml Aliquots einer Zellkultur auf Eis für 30 min aufgetaut und jeweils in 180 µl *E. coli* Lyse-Puffer ohne Lysozym resuspendiert. Anschließend wurden jeder Probe 20 µl Lysozym zugesetzt und die Zellsuspensionen wurden danach für 45 min auf Eis auf einem Tischschüttler bei 100 rpm inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die mechanische Lyse der Zellen in einem Ultraschallbad mit Eiswasser in drei 5 Pulsintervallen von je 5 min Dauer. Zwischen den Pulsen wurden die Proben für 5 min auf Eis gekühlt. Die fertigen Lysate wurden danach für 10 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile und Zelldebris zu pelletieren. Der Überstand wurde im Anschluss in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3 Präparative Proteinextraktion aus *E. coli*

Zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* wurden Proteinextrakte im präparativen Maßstab angefertigt. Die Zellpellets hierfür wurden wie unter 3.2.1.1 beschrieben hergestellt und stammten aus bis zu 18 L Zellkultur. Das Gesamtgewicht der Pellets lag je nach verwendetem Kulturvolumen zwischen 10 und 35 g. Um die korrekte Menge an *E. coli* Lyse-Puffer vorbereiten zu können, wurde einzeln das Gewicht der zu verarbeitenden Pellets festgestellt. Zur Resuspension von 1 g Zellpellet wurden 3 ml Lysepuffer angesetzt. Die tiefgefrorenen Zellpellets (4-8 Pellets, jedes in einem 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß) wurden auf Eis aufgetaut und nach vollständigem Auftauen wurde die dem Gewicht jedes Pellets entsprechende Menge an eisgekühltem Lyse-Puffer hinzugegeben und die Pellets durch Vortexen in den Falcon-Reaktionsgefäßen resuspendiert. Die anschließenden Arbeitsschritte wurden unter Sicherheitsrotlicht durchgeführt. Zu jedem resuspendierten Pellet wurde Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben. Durch Invertieren wurde die Zellsuspension vorsichtig durchmischt und in eine auf 4 °C vorgekühlte große *French-Press*-Zelle eingesaugt. Der gesamte Inhalt aus jedem Falcon-Gefäß wurde jeweils 3x durch die *French-Press* geleitet und aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das Zelllysate in vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt und bei 40.000 g und 4 °C für 90 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und mit Hilfe einer 50 ml Spritze durch 0.22 µm Spritzenvorsatzfilter passiert, um kleine Partikel und Aggregate herauszufiltern. Danach wurde das Lysat mittels Äkta-System auf eine der Anwendung entsprechende Chromatographiesäulen geladen (siehe 3.2.10.1).

### 3.2.4 Proteingehaltsbestimmung

#### 3.2.4.1 Gehaltsbestimmung durch Amidoschwarz-Methode

Die Amidoschwarz-Methode (Popov et al., 1975) wurde routinemäßig zur Proteinbestimmung von Proteingestamtexttrakten und löslichen Proteinextrakten eingesetzt, da diese Methode mit einem breiten Spektrum an Puffern und Pufferzusätzen kompatibel ist. Prinzipiell beruht die Methode darauf, dass der Farbstoff *Amidoschwarz 10B* spezifisch und quantitativ an frei zugängliche Aminogruppen der durch ein Methanol-Essigsäure-Gemisch präzipitierten

Proteine bindet. Der ungebundene Überschuss des Farbstoffes wird durch einen Waschschrift mit Waschlösung entfernt. Durch anschließendes Resuspendieren der Proteine in 0.2 M NaOH wird durch die alkalische Wirkung der an die Aminogruppen gebundene Farbstoff wieder in die Lösung freigesetzt. Durch photometrische Absorptionsmessungen der Lösungen bei 615 nm kann dann die Proteinkonzentration durch Vergleich mit den Absorptionswerten einer zuvor erstellten BSA-Kalibrierungsreihe ermittelt werden.

Zum Ansetzen der Proben wurden jeweils 5-10 µl der zu bestimmenden Proteinelösung in 1 ml Reaktionsgefäße überführt und mit bidestilliertem Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Als Referenz diente eine proteinfreie Probe mit 200 µl bidestilliertem Wasser. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 800 µl Amido-Schwarz Lösung hinzugegeben, die Proben durch mehrfaches Invertieren vermischt und danach für 10 min bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben wurden mit je 1 ml Waschlösung versetzt und durch Vortexen gut durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min bei RT wurde die Waschlösung dekantiert und die Proben unter einem Laborabzug ca. 10 min trocknen gelassen. Nachdem die Reste der Waschlösung verdunstet waren, wurde jeder Probe 1 ml 0.2 M NaOH zugegeben. Nach erneutem Vortexen wurden die Proben in 1 ml Einmalküvetten aus Plastik überführt und die OD<sub>615</sub> gegen die Referenz in einem Photometer gemessen. Anhand einer mit BSA-Lösung erstellten Kalibrierungsreihe konnte die Proteinkonzentration der einzelnen Proben rechnerisch bestimmt werden.

### **3.2.5 Durchführung einer analytischen SDS-PAGE nach Lämmli**

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (Laemmli, 1970) werden die Proteinproben durch Versetzen mit einem SDS-haltigen Probenpuffer und anschließendes Aufkochen bei 95 °C für 10 min im Thermoblock denaturiert. Das negativ geladene Detergenz SDS stört intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen und komplexiert mit den Proteinen (1 SDS-Molekül pro 2 AS), wodurch ein ähnliches Ladung/Masse Verhältnis eingestellt wird. Dies gewährleistet, dass die Proteine bei der Gelelektrophorese im Spannungsfeld nach Molekulargewicht unabhängig von ihren Nettoladungen durch Wandern zur Anode aufgetrennt werden. Das Lämmli-Gel-System besteht aus drei Komponenten: Dem Glycin-haltigen Laufpuffer, dem Trenngel und dem Sammelgel. Trenn- und Sammelgel haben ein Tris-HCl-basiertes Puffersystem mit unterschiedlichen pH-Werten. Der pH-Wert

des Sammelgels liegt bei 6.8, während der pH-Wert des Trenngels bei 8.8 liegt. Der Glycin-haltige, Tris-basierte Laufpuffer hat einen pH-Wert von 8.3. Die unterschiedlichen pH-Werte aller Komponenten gewährleisten die Funktion des Sammelgels. Das Glycin im Laufpuffer spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Wird nach Gelbeladung die Spannung am Gel angelegt, wandern die im Laufpuffer (pH 8.3) als Anionen vorliegenden Glycinionen in das Sammelgel. Der pH-Wert (pH 6.8) im Sammelgel sorgt dafür, dass Glycin in seiner Zwitterionischen Form vorliegt, wodurch die Laufgeschwindigkeit zur Anode herabgesetzt wird. Die im Sammelgel ebenfalls enthaltenen Chlorid-Ionen wandern jedoch schneller als die Glycin-Zwitterionen. Es entstehen so mit den Chloridionen als Leitonen und den Glycin-Zwitterionen als Folgeionen zwei mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wandernde Ionenfronten, zwischen denen sich ein Spannungsgradient aufbaut, der die elektrische Feldstärke verstärkt. Die Proteine befinden sich in dem Spannungsfeld zwischen Leit- und Folgeionen und werden durch die höhere Feldstärke beschleunigt, bis sie kurz hinter den Leitonen in einer engen Zone laufen. Vor Erreichen der Leitonen werden die schnell laufenden Proteine durch deren negative Ladung abgebremst. So entsteht eine einheitliche Lauffront der Proteine vor dem Eintritt ins Trenngel. Beim Eintritt beider Ionenfronten in das Trenngel erhöht sich die Mobilität der Glycin-Ionen, die nun bedingt durch den höheren pH-Wert wieder als Anionen vorliegen. Dadurch werden die Glycin-Ionen stark beschleunigt, laufen an den Proteinen vorbei und heben somit den Spannungsgradienten auf, wodurch die Proteine aus der Konzentrationszone entlassen werden und sich im weiteren Verlauf des Trenngels nach ihrem Molekulargewicht auftrennen.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde eine Mini Protean<sup>®</sup> 3 Apparatur verwendet. Vor dem Zusammenbau der Gießapparatur wurden die Glasplatten mit 1%iger SDS-Lösung gereinigt, mit Wasser abgespült und mit fusselfreien Tüchern abgetrocknet.

Nachstehendes Pipettierschema bezieht sich auf die Herstellung von zwei SDS-PAGE Mini-Gelen mit folgender Zusammensetzung:

Trenngel:	10% (v/v) Acrylamid; 0.265% (v/v) Bisacrylamid; 375 mM Tris-Cl, pH 8.8; 0.1% (w/v) SDS
Sammelgel:	3.5% (v/v) Acrylamid; 0.13% (v/v) Bisacrylamid; 125 mM Tris-Cl, pH 6.8; 0.2% (w/v) SDS



Komponente	Trenngel 10%	Sammelgel 3.5%
Acrylamid-Stammlösung	5 ml	1.25 ml
Trenngel-Puffer	2.5 ml	---
Sammelgel-Puffer	---	1.25 ml
A. bidest	2.5 ml	2.45 ml
10% SDS-Stammlösung	100 µl	100 µl
10% APS-Stammlösung	40 µl	37.5 µl
TEMED	6 µl	2.5 µl

### 3.2.6 Coomassie-Färbung von SDS-PAGE Gelen

Zum Sichtbarmachen von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurden die Gele nach der Elektrophorese in Coomassie-Färbelösung eingelegt und auf einem Tischschüttler bei 150 rpm für 2 h oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung dekantiert und durch Entfärbe-Lösung ersetzt. Die Gele wurden über Nacht bei 150 rpm entfärbt und nur die dauerhaft gefärbten Proteinbanden blieben sichtbar.

Alternativ können die Gele auch in der Färbelösung in einer Mikrowelle für ca. 30 s aufgeköcht werden. Nach dem Abkühlen wird die Färbelösung verworfen, die Gele mit Entfärbe-Lösung überschichtet und erneut für ca. 30 s in der Mikrowelle aufgeköcht. Durch diese Methode können die Färbe- und Entfärbeprozesse deutlich beschleunigt werden, ohne dass die Qualität der Gele darunter leidet.

### 3.2.7 Färbung von SDS-PAGE Gelen mit Colloidalem Coomassie

Sollen die Gelbanden aus Polyacrylamidgelen nach der Gelelektrophorese und der anschließenden Färbung für massenspektroskopische Analysen genutzt werden, müssen die Gele mit colloidalen Coomassie-Färbelösung behandelt werden. Hierzu wird eine frische Färbelösung bestehend aus 80% (v/v) Colloidale Coomassie Stammlösung und 20% (v/v) Methanol angesetzt (siehe 2.3).

Für das Einfärben eines Minigels wurden auf diese Weise 40 ml der Stammlösung mit 10 ml Methanol versetzt. Das Gel wurde mit der Färbelösung überschichtet und über Nacht bei 150 rpm auf einem Tischschüttler inkubiert. Zum Entfärben des Gels wurde die Färbelösung verworfen und durch A. bidest ersetzt und die Inkubation auf dem Tischschüttler fortgesetzt. Während der Entfärbung wurde das A. bidest mehrmals ausgewechselt, bis der Gelhintergrund komplett entfärbt war und nur noch die eingefärbten Proteinbanden sichtbar waren.

### 3.2.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot

Zur immunologischen Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurden die Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung durch SDS-PAGE von dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

Hierzu wurden die Ladetaschen des Gels mit einem Skalpell abgetrennt und die Nitrozellulosemembran und das *Blotting*-Papier auf die Größe des Gels zugeschnitten. Das Gel, die Membran und das *Blotting*-Papier wurden dann für 10 min in WB-Transferpuffer äquilibriert. Im Anschluss wurde der WB auf einer Glasplatte folgendermaßen zusammengesetzt: Auf eine Schicht *Blotting*-Papier wurde zuerst die Nitrozellulosemembran und dann das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Abschließend wurde auf das Gel eine Schicht *Blotting*-Papier luftblasenfrei aufgebracht. Beim anschließenden Einbringen des WB in eine Blotting-Apparatur musste die korrekte Anordnung des Sandwiches im elektrischen Feld beachtet werden. Die Membran zeigte hierbei jeweils zur Anode, das Gel zur Kathode.

Für den WB-Transfer mittels des *Semi-Dry-Blotting* Systems von Bio-Rad wurde der WB auf die Graphit-Anode überführt und nochmals mit WB-Transferpuffer benetzt. Nach aufsetzen der Kathode und schließen des Deckels erfolgte der Transfer der Proteine auf die Membran bei konstanter Spannung von 21 V für 1 h.

Beim Transfer der Proteine mittels des *Wet-Blot* Systems von Bio-Rad wurde das Sandwich nach Angaben des Herstellers in die dafür vorgesehenen Klemmen eingespannt und in den *Blotting*-Tank eingebracht. Nach befüllen des Tanks mit WB-Transferpuffer erfolgte der Transfer der Proteine auf die Membran bei 100 V und 0.35 A für 1 h.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h bei 100 rpm auf einem Tischschüttler in 20 ml Blocking-Puffer eingelegt, um von Proteinen unbesetzte Stellen der Membran mit

Milcheiweißen zu blocken. Anschließend wurde der *Blocking*-Puffer dekantiert und die Membran mit 20 ml Primär-Antikörperlösung (siehe 2.7) überschichtet und für 1 h bei 100 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Primär-Antikörperlösung aufbewahrt, da sie mehrfach verwendet werden konnte. Die Membran wurde zum Waschen mit 20 ml TBS-T Puffer überschichtet und für 10 min bei 100 rpm inkubiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, wobei der Puffer jeweils durch frischen Puffer ersetzt wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Waschpuffer verworfen und durch 20 ml Sekundär-Antikörperlösung (siehe 2.7) ersetzt. Die Membran wurde erneut für 1 h bei 100 rpm in der Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Sekundär-Antikörperlösung verworfen und die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen. Danach konnte die Membran direkt mit dem *Odyssey-infrared-imaging* System von LI-COR eingescannt werden.

### **3.2.9 Analyse von SDS-Gelen und Western-Blots**

Zur qualitativen und quantitativen Analyse wurden WB-Membranen und coomassie gefärbte Gele mit dem LI-COR *Odyssey-infrared-imaging* System eingescannt. Dieser Infrarot-Scanner verfügt über zwei Fluoreszenzanregungskanäle. Durch zwei Diodenlaser wird Anregungslicht von 685 nm bzw. 785 nm erzeugt. Die Fluoreszenzsignale beider Kanäle werden durch einen dichroitischen Filter werden getrennt, so dass eine gleichzeitige Detektion beider Signale möglich ist.

#### **3.2.9.1 Einscannen von coomassie-gefärbten SDS-Gelen**

Zum Einscannen von coomassie gefärbten Gelen (auch colloidale Coomassie) wurde die Scanneroberfläche mit Ethanol und einem fusselfreien Papiertuch gereinigt. Anschließend wurde etwas A. bidest auf die Stelle der Scanneroberfläche geträufelt, wo das Gel platziert werden sollte. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die benetzte Oberfläche aufgelegt. Das Wasser verhinderte das Anhaften des Gels an der Glasoberfläche und ermöglichte ein Verschieben des Gels zur genauen Platzierung. Zum Einscannen wurde der 700 nm Kanal gewählt. Die Intensitätseinstellung lagen hierbei zwischen 4 und 7. Nach dem digitalen

Erfassen des Gels konnte mit Hilfe der zugehörigen Software die Bildqualität bearbeitet werden.

### **3.2.9.2 Einscannen von Western-Blot Membranen**

Um eine WB-Membran einzuscannen, musste zuvor eine immunologische Detektion mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern durchgeführt werden (siehe 2.7 und 3.2.8). Diese IRDye<sup>®</sup> Sekundärantikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der entweder bei 700 nm oder bei 800 nm angeregt werden kann. Welcher sekundäre Antikörper verwendet wurde hing von der Spezifikation des verwendeten primären Antikörpers ab. Wurde nur ein Detektionskanal benutzt, so wurde in der Regel ein Sekundärantikörperkonjugat mit einer Anregungswellenlänge von 800 nm verwendet, da dieser Detektionskanal weniger Hintergrundfluoreszenz erfasste.

Vor dem Einscannen der Membran wurde die Scanneroberfläche mit einem fusselfreien Tuch und Ethanol gereinigt. Die Stelle, wo die Membran platziert werden sollte, wurde zuvor etwas mit TBS-T Puffer benetzt. Die Membran wurde anschließend luftblasenfrei auf die benetzte Oberfläche platziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Membran mit der Oberseite (die Seite, die beim WB-Transfer zum Gel zeigte) auf die Glasfläche aufgelegt wurde. Das Einscannen der Membran erfolgte je nach Anforderung mit nur einem Detektionskanal oder mit beiden Kanälen. Die Intensitätseinstellungen lagen hierbei beim 700 nm Kanal zwischen 3 und 6 und beim 800 nm Kanal zwischen 5 und 7. Nachdem das Bild der Membran digital erfasst worden war, konnte eine qualitative und quantitative Auswertung mit Hilfe der Software durchgeführt werden.

### **3.2.10 Proteinaufreinigung mit dem Äkta-System**

Zur Durchführung von FPLC-basierten Chromatographiemethoden wurde ein Äkta-Purifier von GE Healthcare (Freiburg) eingesetzt. Neben zwei getrennt voneinander operierenden Systempumpen (Pumpe A und B) verfügte das System zusätzlich über eine Ladepumpe (P-960), mit der das zuvor zentrifugierte und gefilterte Lysat auf die entsprechende Chromatographiesäule geladen werden konnte. Zur Überwachung des gesamten

Chromatographieprozesses wurde neben der Leitfähigkeit (*conductivity*) sowohl der Ladedruck (*sample pressure*), der Systemdruck (*pressure*) als auch die Flussraten (*flow rate*) und Durchflussvolumina (*volume*) automatisch überwacht. Durch einen UV-Detektor (UV-900) konnte zusätzlich noch die Absorption bei drei unterschiedlichen Wellenlängen (jeweils im Bereich von 200-800 nm) unabhängig voneinander detektiert werden. Zur Fraktionierung der Eluate wurde ein Fraktionskollektor (Frac-950) verwendet.

### 3.2.10.1 Aufreinigung von Proteinen über Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Bei der heterologen Expression im Zielvektor werden die Proteine mit einem sechsfachen Histidin-Tag (*His<sub>6</sub>-Tag*) versehen. Das Prinzip der Ni-NTA-Affinitätschromatographie, auch *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC) genannt, beruht darauf, dass die Imidazolringe der Histidine des *His<sub>6</sub>-Tags* durch Nickelionen gebunden werden, welche über vier ihrer sechs Koordinationsstellen durch Nitrilotriessigsäure (NTA) an einer Sepharosematrix immobilisiert wurden. Die übrigen zwei Koordinationsstellen stehen so für die Bindung mit den freien Elektronenpaaren des Stickstoffs im Imidazolring der Histidine zur Verfügung.

Wird ein Zelllysats mit Histidin-getagten Proteinen auf eine solche Säulenmatrix appliziert, werden die rekombinanten Proteine im Lysat über Anbindung an die Matrix selektiv angereichert und verbleiben assoziiert mit der Matrix. Durch einen nachfolgenden Waschschriff wird die Reinheit der gebundenen Proteine weiter erhöht, indem nicht gebundene Proteine und unspezifische Kontaminationen von der Säulenmatrix entfernt werden. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgt, indem das Struktur analogon Imidazol im Elutionspuffer schrittweise erhöht und dadurch das Histidin von den Matrixbindungsstellen entfernt wird.

Zur Durchführung der IMAC wurde ein ÄKTA *purifier* der Firma Amersham mit dem publizierten Protokoll für cry1-PHR aus pACYCDuet-1 verwendet (Orth et al., 2017).

Hierfür wurden die unter 3.2.3 hergestellten Lysate verwendet. Der gesamte Aufreinigungsprozess wurde unter Sicherheitsrotlicht bei 4°C durchgeführt.

Vor der Aufreinigung wurde das komplette FPLC-System inklusive IMAC-Säule mit Lagerungslösung (Filtriertes MilliQ-Wasser mit 0,02% NaN<sub>3</sub>; entgast) gespült und im

Anschluss daran in gleicher Weise mit Laufpuffer äquilibriert. Die einzelnen Schritte des verwendeten FPLC-Programms sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Schritt	High Imidazol Puffer	Imidazol Konzentration	Säulenvolumen
Säuenäquilibrierung	2%	10 mM	3
Laden des Lysates	2%	10 mM	variabel
Waschen der Säule	2%	10 mM	20
Elution	2-100%	10-500 mM	30
Gradient Delay	100%	500 mM	8
Re-äquilibrierung der Säule	2%	10 mM	3

Durch einen UV-Detektor wurde der Verlauf der Aufreinigung durch Detektion der Absorption bei 260 nm, 280 nm und 450 nm verfolgt und dokumentiert.

### 3.2.10.2 Aufreinigung von Proteinen über SizeExclusion Chromatography (SEC)

Bei der Größenausschlusschromatographie beruht die Reinigung auf einer Trennung der Proteine anhand ihrer Größe, wobei aber auch Faktoren wie die Form der Proteine und deren hydrodynamischer Radius eine Rolle spielen. Die unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeit innerhalb einer porösen Matrix sorgt so für eine Auftrennung der Proteine. So kann beispielsweise zwischen Monomeren und Multimeren oder Aggregaten unterschieden werden. Kleinere Moleküle sind in der Lage, in die Poren der Matrix einzudringen, wodurch ihre Retentionszeit im Gegensatz zu größeren Molekülen deutlich erhöht wird.

Anwendung findet die Größenausschlusschromatographie nicht nur zum Zwecke der Aufreinigung von Proteinen, sondern auch zum Umpuffern und zur nativen Größenbestimmung.

Nach Waschen und Äquilibrieren von System, Systemschläuchen und Säule mit jeweils zwei Säulenvolumen wurde die Säule zunächst mit Proteinstandards kalibriert. Dazu wurden dieselben Konditionen genutzt wie bei der späteren Probe auch. Nach dem Durchlauf der eigentlichen Probe konnte nun anhand der Kalibrierung die Größe des Zielproteins abgeschätzt werden.

### 3.2.11 Anreichern und von Proteinlösungen

Da nach der Größenausschlußchromatographie die Proteinkonzentration durch das hohe Elutionsvolumen sehr gering war, erfolgte eine Ankonzentration der Proteinlösung mittels Amicon® Ultra-15 Zentrifugationsfiltereinheiten mit einem Molekülgrößenausschluss von 30 kDa. Dementsprechend passieren Moleküle, die kleiner sind als 30 kDa die Membran, während größere Moleküle von der Membran zurückgehalten werden. Hierzu wurde die Proteinlösung unter Herstellerangaben in einer auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge mit Schwingbecherrotor bei 4500 rpm in mehreren 10-15 minütigen Zentrifugationsschritten ankonzentriert. Hierbei wurde nach jedem Zentrifugationsschritt der Membrandurchfluss entfernt und so lange Proteinlösung nachgegeben, bis die gewünschte Konzentration erreicht wurde. Zwischen den Zentrifugationen wurde die Proteinlösung im Konzentrator durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt, um das entstehende Konzentrationsgefälle immer wieder zu homogenisieren. Dies verhindert eine Präzipitation der Proteine durch erhöhte lokale Konzentrationen an der Membran.

### 3.2.12 UV/Vis-Spektroskopie von Proteinlösungen

#### 3.2.12.1 Aufnahme der Kinetik der Photoreduktion des FAD-Kofaktors

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde die UV-Vis-Spektroskopie genutzt, um den FAD-Kofaktor des Cryptochroms zu charakterisieren. Durch den Vergleich der gemessenen Absorptionsspektren mit spezifischen Absorptionsspektren der verschiedenen Redoxzustände kann die Photoreduktion verfolgt werden.

Verwendet wurde ein Zweistrahlphotometer, welches die Absorption der Probe gegen eine Referenzküvette mit Puffer misst. Die Bestimmung der Basislinie im Meßbereich wurde mit zwei puffergefüllten Küvetten durchgeführt. Für die Messung der Proteinlösungen wurde 10 µM Protein eingesetzt, um auswertbare Ergebnisse zu erzielen. Als externes Reduktionsmittel wurden in allen Studien 20 mM DTT zugesetzt, um die Photoreduktion zu ermöglichen. Die Bestrahlung erfolgte mittels einer gekühlten Xenon-Lampe, deren Emission durch Verwendung eines Interferenzfilters auf 450 nm reguliert wurde. Die verwendete Lichtintensität betrug 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Da Photoreduktion sowie Dunkelreversion auch Temperatur abhängig sind, wurden alle Messungen bei konstant 10 °C durchgeführt.

Zur Aufnahme von Differenzspektren wurden 300 µl einer 12,5 µM Proteinlösung mit 25 mM DTT auf zwei Küvetten verteilt. Die Referenzküvette wurde hierbei im Dauerdunkel gehalten, während die Probenküvette für verschiedene Intervalle dem Blaulicht ausgesetzt wurde. So konnte sichergestellt werden, dass jede Probe den gewünschten Redoxzustand des FAD hatte, bevor die Proben weiteren Analysen zugeführt wurden.

### 3.2.12.2 Auswertung der Photoreduktionskinetiken

Der quantitativen Auswertung der Photoreduktionskinetiken liegt die Annahme zugrunde, dass während der Belichtungsdauer außer  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  und  $\text{FADH}^\circ$  keine weiteren FAD-Spezies auftreten, d.h., dass sich die Gesamtkonzentration an FAD ( $\text{FAD}_{\text{tot}}$ ) aus den Teilmengen der Konzentrationen von  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  und  $\text{FADH}^\circ$  zusammensetzt:

$$C_{\text{FAD}_{\text{tot}}} = C_{\text{FAD}_{\text{ox}}} + C_{\text{FADH}^\circ} \quad (\text{i})$$

Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass während allen durchgeführten Belichtungen zu keiner Zeit eine weitere stabile FAD-Spezies festgestellt werden konnte.

Aufgrund der Absorptionseigenschaften von  $\text{FADH}^\circ$  ist dies die einzige FAD-Spezies, deren Absorptionsmaximum bei 560 nm sich mit keiner der weiteren stabilen FAD-Spezies überschneidet. Dies bedeutet, dass die Absorption bei 560 nm ausschließlich durch  $\text{FADH}^\circ$  hervorgerufen wird. Somit kann durch die Absorption bei 560 nm unter Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  die Konzentration von  $\text{FADH}^\circ$  ( $C_{\text{FADH}^\circ}$ ) berechnet werden:

$$C_{\text{FADH}^\circ} \left[ \frac{\text{M}}{\text{L}} \right] = \frac{A_{560 \text{ nm}}}{\varepsilon_{\text{FADH}^\circ_{560 \text{ nm}}} \quad (\text{ii})$$

Anders verhält es sich beim Absorptionsmaximum von  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  bei 450 nm. Dieses setzt sich zusammen aus den Absorptionen von  $\text{FAD}_{\text{ox}}$ ,  $\text{FADH}^\circ$ ,  $\text{FADH}^-$  und  $\text{FAD}^\circ$ . Aufgrund der oben gemachten Annahme wird die Bildung von  $\text{FADH}^-$  und  $\text{FAD}^\circ$  ausgeschlossen. Durch diese



Annahme wird die Berechnung der tatsächlichen Absorption von  $FAD_{ox}$  anhand der gemessenen Absorption bei 450 nm unter Beachtung des molaren Extinktionskoeffizienten von  $FADH^o$  bei 450 nm stark vereinfacht:

$$A_{FADH_{450\text{ nm}}^o} = C_{FADH^o} \left[ \frac{M}{L} \right] \times \varepsilon_{FADH_{450\text{ nm}}^o} \quad (\text{iii})$$

$$A_{FAD_{ox450\text{ nm}}} = A_{450\text{ nm}} - A_{FADH_{450\text{ nm}}^o} \quad (\text{iv})$$

Anhand der tatsächlichen Absorption von  $FAD_{ox}$  bei 450 nm kann nun die Konzentration von  $FAD_{ox}$  ( $C_{FAD_{ox}}$ ) unter zu Hilfenahme des molaren Extinktionskoeffizienten berechnet werden:

$$C_{FAD_{ox}} \left[ \frac{M}{L} \right] = \frac{A_{FAD_{ox450\text{ nm}}}}{\varepsilon_{FAD_{ox450\text{ nm}}}} \quad (\text{v})$$

Die molaren Extinktionskoeffizienten, die für diese Berechnungen nötig waren, wurden der Publikation von Müller et al. (Müller et al., 2015) entnommen. In dieser Veröffentlichung wurde der molare Extintionskoeffizient des Holoproteins von *Atcry1* bei 450 nm im vollständig oxidierten Zustand experimentell ermittelt. Das Spektrum, dem die molaren Absorptionskoeffizienten von  $FADH^o$  bei 560 nm und 450 nm entnommen wurden, wurde mathematisch aus photometrischen Messungen einer Mischung aus  $FAD_{ox}$  und  $FADH^o$  berechnet.

Folgende molaren Extinktionskoeffizienten wurden verwendet:

$$\varepsilon_{FAD_{ox\ 450\text{ nm}}} = 11\ 300$$

$$\varepsilon_{FADH_{450\text{ nm}}^o} = 5000^*$$

$$\varepsilon_{FADH_{560\text{ nm}}^o} = 4200^*$$

Die mit (\*) gekennzeichneten Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe der Software *GetData Graph Digitizer* Version 2.26.0.20 (Copyright © 2002-2013, S. Fedorov) aus *Figure 2* der oben erwähnten Veröffentlichung ermittelt.

Die so berechneten tatsächlichen Konzentrationen von  $FAD_{ox}$  und  $FADH^o$  wurden im Weiteren dazu verwendet, die gemessenen Absorptionen bei 450 nm um den Absorptionsanteil des  $FADH^o$  zu korrigieren. Diese korrigierten Werte wurden zur Erstellung der Photoreduktionskinetiken verwendet und liegen somit auch den Berechnungen der

Halbwertszeiten zugrunde. Aus diesem Grund sind die Y-Werte der Graphen als Verhältnis von  $FAD_{ox}$  bzw.  $FADH^o$  zu  $FAD_{tot}$  angegeben.

Rechenbeispiel für Zeitpunkt 0 min für cry1WT ohne Zugabe von ATP:

Gemessene Absorption bei 560 nm: 0.001564

$$\text{Einsetzen in (ii): } C_{FADH^o} \left[ \frac{M}{L} \right] = \frac{0.001564}{4200} = 0.000000372 \frac{M}{L}$$

$$\text{Einsetzen in (iii)} \quad A_{FADH^o_{450 \text{ nm}}} = 0.000000372 \left[ \frac{M}{L} \right] \times 5000 = 0.001861905$$

Gemessene Absorption bei 450 nm: 0.079254

$$\text{Einsetzen in (iv)} \quad A_{FAD_{ox_{450 \text{ nm}}}} = 0.079254 - 0.001861905 = 0.077392095$$

$$\text{Einsetzen in (v)} \quad C_{FAD_{ox}} \left[ \frac{M}{L} \right] = \frac{0.077392095}{11\,300} = 0.000006849 \frac{M}{L}$$

$$C_{FAD_{ox}} = 0.000006849 \frac{M}{L}$$

$$C_{FADH^o} = 0.000000372 \frac{M}{L}$$

$$\text{Einsetzen in (i)} \quad C_{FAD_{tot}} = 0.000006849 \frac{M}{L} + 0.000000372 \frac{M}{L} = 0.00000722 \frac{M}{L}$$

Berechnung der prozentualen Anteile von  $C_{FAD_{ox}}$  und  $C_{FADH^o}$  an  $C_{FAD_{tot}}$  liefert:

$$FAD_{ox} = 98.8\%$$

$$FADH^o = 5.2\%$$

Auf die gezeigte Weise wurden alle weiteren Werte aus den gemessenen Datenpunkten errechnet und anschließend für die Erstellung der Photoreduktionskinetiken genutzt.

Bei den Kinetiken der Dunkelreversionen wurde ebenso verfahren. Manche Dunkelreversionskinetiken hatten einen linearen Verlauf. In diesem Fall wurde zur Berechnung der Halbwertszeit die Steigung der Geraden benutzt. Die Steigung entspricht in

diesem Fall der Zerfallskonstanten  $\lambda$ . Um von der Zerfallskonstanten auf die Halbwertszeit zu schließen, wurde folgende Formel benutzt:  $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda}$

### 3.2.13 Untersuchungen der Proteinstabilität in Gegenwart von Nukleotiden

Um zu klären, ob die verwendeten Nukleotiden ATP, ADP, AMP-PNP, NADP und NADPH einen Einfluss auf die Stabilität der getesteten Proteine haben, wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze getestet. Im ersten Ansatz wurde die Protease Trypsin verwendet, um zu untersuchen, ob die Sensitivität der Proteine gegenüber proteolytischer Spaltung durch Nukleotide verändert wird. Der zweite Ansatz verwendet einen thermodynamischen Ansatz, bei dem durch eine Erhöhung der Temperatur eine Denaturierung der Proteine herbeigeführt wird. Hier soll geprüft werden, ob die Gegenwart von Nukleotiden die thermische Stabilität der Proteine beeinflusst. Zusätzlich zu den oben genannten Nukleotiden wurden noch NAD und NADH in die Versuchsanordnung einbezogen.

#### 3.2.13.1 Partieller Abbau von Proteinen durch Trypsin

Die partielle Proteolyse mit Trypsin ist eine Methode, mit der indirekt Konformationsänderungen eines Proteins untersucht werden können (Halliday et al., 1984; Partch et al., 2005). Die Methode beruht darauf, dass durch Konformationsänderungen bestimmte Bereiche des Proteins für die Protease leichter bzw. schwerer zugänglich sind und es dementsprechend zu Änderungen im Fragmentmuster in der Gelelektrophorese kommt.

Bei der partiellen Trypsinierung der aufgereinigten cry1-PHR Konstrukte wurden sowohl von vorbelichteten als auch von dunkeladaptierten Proben (siehe auch 3.2.12) jeweils 15 µl mit 4 µl Stocklösung der jeweiligen Nukleotide (5 mM in Lagerungspuffer) oder mit Proteinlagerungspuffer (Proben ohne Nukleotid) vermischt. Die Proben wurden dann 10 min auf Eis inkubiert, um die Anbindung der Nukleotide sicherzustellen. Danach wurde jeder Probe 1 µl Trypsinlösung (200 µM in 1 mM HCl; 20 mM CaCl<sub>2</sub>) zugegeben. Proben ohne Trypsin wurden stattdessen mit 1 µl Trypsinpuffer (1 mM HCl; 20 mM CaCl<sub>2</sub>) versetzt.

Alle Proben wurden im Anschluss für 30 min bei 30 °C unter Rotlicht inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Trypsin-Stop-Puffer (5 mM EDTA und 5 mM

PMSF in 5x SDS-Probenpuffer) gestoppt. Direkt im Anschluss wurde jeweils das gesamte Probenvolumen auf einer analytische SDS-PAGE aufgetrennt. Die Banden wurden nachfolgend durch Färbung mit kolloidaler Coomassielösung visualisiert und über das Licor Odyssey System eingescannt und quantitativ mit der Odyssey Software ausgewertet.

### 3.2.13.2 Durchführung von ThermoFAD-Assays

Mittels ThermoFAD kann der Schmelzpunkt eines Proteins mit einem Real-time PCR cyclers bestimmt werden. Hierzu wird der Proteinlösung ein hydrophober Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt, dessen Fluoreszeigenschaften sich verändern, wenn er an hydrophobe Proteinoberflächen bindet. Durch die Bindung erhöht sich die Fluoreszenz stark. Diese Veränderung kann mit dem Fluoreszenzdetektor des Real-time PCR cyclers verfolgt werden. Hierbei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die hydrophoben Bereiche sich im Inneren der Proteinstruktur befinden. Diese hydrophoben Bereiche werden freigesetzt, wenn die Proteinstruktur kollabiert. Dies wird durch schrittweises Erhitzen der Proteinlösung im PCR-cycler erreicht, wobei die Zunahme an Fluoreszenz mit dem Zusammenbruch der Proteinstruktur korreliert ist. Dabei ist der Schmelzpunkt  $T_m$  eines Proteins definiert, als die Temperatur, bei der die native und entfaltete Form des Proteins im Gleichgewicht liegen. Dieser Punkt entspricht dem Wendepunkt der sigmoidalen Kurve, die sich ergibt, wenn die aus dem Entfalten des Proteins entstehende Fluoreszenz gegen die Temperatur geplottet wird. Im Falle der Schmelzpunktbestimmung von cry1-PHR war es nicht nötig einen hydrophoben Farbstoff zuzusetzen, da man sich die Freisetzung des FAD-Kofaktors zu Nutze machen kann: Hierbei wird die Freisetzung des FAD gleichgesetzt mit dem thermodynamischen Kollabieren der Proteinstruktur. Während FAD mit dem Protein verbunden ist, wird die Fluoreszenz stark gequenched. Die Freisetzung sorgt für einen Fluoreszenzanstieg, der mit dem Fluoreszenzdetektor aufgenommen werden kann.

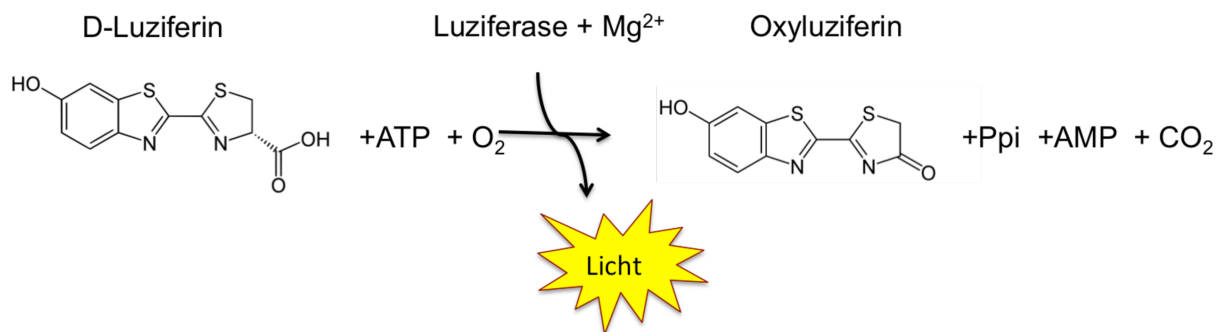
Das Anbinden von Nukleotiden an ein Protein kann dessen Schmelzverhalten beeinflussen. Dies schlägt sich in einer Veränderung des Schmelzpunktes nieder und ermöglicht zum Einen den Vergleich der Schmelztemperatur von Proteinlösungen mit bzw. ohne Nukleotid, ermöglichte zum Andern aber auch den Vergleich von im Dunkel inkubierten Proteinlösungen und belichteten Proteinlösungen in Gegenwart von Nukleotiden. Durch Vergleiche der ermittelten Schmelztemperaturen konnte so eine Aussage über den Einfluss

der Nukleotide auf die Proteinstabilität getroffen und gleichzeitig der Effekt von Licht auf die Nukleotidbindung untersucht werden.

Die ThermoFAD *assays* wurden gemäß dem publizierten Protokoll durchgeführt (Orth et al., 2017)

### 3.2.14 Luziferase-basierter ATP-Bindungs-Assay

Mit Hilfe des Luziferase-basierten ATP-Bindungs-Assays sollte versucht werden, die Dissoziationskonstante  $K_D$  der cry1 PHR Proteine in einer Näherung zu bestimmen.



**Abb. 21. Luziferase Reaktion:** Das Substrat Luziferin wird durch die Luziferase unter Umwandlung von ATP und Sauerstoff in Oxyluziferin umgewandelt. Hierbei entsteht neben Licht auch  $\text{CO}_2$  und AMP.

Wie in Abb. 21 gezeigt ist, braucht die Luziferase zur Erzeugung von Licht neben dem Substrat Luziferin auch das Kosubstrat ATP. Diese Tatsache kann man sich zu Nutze machen, um die ATP-Konzentration in Proben zu bestimmen. Mithilfe eines Luminometers können über einen definierten Zeitraum entstehende Photonen gemessen und in Counts wiedergegeben werden. Mit Hilfe einer ATP-Kalibrierungsgeraden mit bekannten Konzentrationen ist es möglich, die in der Probe gemessenen Counts einem bestimmten Wert der Kalibriergeraden zuzuordnen und so auf die in der Probe befindliche Konzentration an ATP zu schließen.

Der Luziferase-basierte ATP-Bindungs-Assay kombiniert einen klassischen Pull-down Assay mit dem Luziferase Assay: Hierbei wird rekombinantes cry1 PHR Protein in unterschiedlichen Konzentrationen über das N-terminale His-Tag an Ni-NTA-Magneto-Beads gekoppelt. Im nächsten Schritt werden die Beads mit den gekoppelten Proteinen in eine ATP-

Lösung bekannter Konzentration gegeben. Nach einer Inkubationszeit werden die Beads mit einem Magnet an den Boden des Reaktionsgefäßes gezogen, der ATP-haltige Überstand abgenommen und der Messung im Luminometer zugeführt. Durch Vergleich einer ATP-Probe, die nicht mit proteingekoppelten Beads inkubiert wurde, kann die maximale Konzentration an ATP festgestellt werden. Lässt man die gleiche Menge an Magneto Beads mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen inkubieren, so erhält man der Proteinkonzentration entsprechend unterschiedliche Kopplungsverhältnisse zwischen Beads und Protein. Dementsprechend wird das ATP in der Probe während der Inkubation unterschiedlich stark abgereichert. Man kann nun die gemessenen ATP Konzentrationen der Überstände gegen die eingesetzte Proteinkonzentration plotten. An dem Punkt, wo der Graph das halbmaximale Signal der ATP Kontrolle anzeigt kann die Proteinkonzentration abgelesen werden, die benötigt wurde, um 50 % des in der Probe befindlichen ATP's abzureichern. Dieser Wert entspricht dann näherungsweise der Dissoziationskonstanten  $K_D$ .

Der ATP-Binde-Assay wurde folgendermaßen durchgeführt:

Für den Assay wurde das Molecular Probes<sup>TM</sup> ATP-Bestimmungskit (Thermo Fisher) verwendet. Alle mitgelieferten Lösungen wurden entsprechend den Herstellerangaben angesetzt. Es wurden Proteinlösungen von *cry1* WT PHR und *cry1*/Y402A mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M.

Für jeden Ansatz wurden je 70  $\mu$ l der Ni-NTA-Magneto-Beads in separate Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und 3x mit SEC+ Puffer gewaschen und equilibriert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Puffer komplett entfernt und die Proteinlösungen wurden zu den Beads pipettiert und vermischt. Um eine möglichst komplette Anbindung der rekombinanten Proteine an die Beads zu gewährleisten, folgte eine Inkubation der Gemische für 1 h auf Eis. Die Reaktionsansätze wurden hierbei alle 15 min durch vorsichtiges Invertieren gemischt, um ein Absetzen und Verkleben der Beads zu verhindern. Nach der Inkubationszeit wurden die Beads durch den Magnetständer am Rande des Reaktionsgefäßes fixiert. Der Überstand wurde abgenommen und für weitere Analysen aufbewahrt. Nach einem Wachschrift mit Puffer wurden die Beads erneut magnetisch fixiert und der Überstand abgenommen. Im Anschluss wurden zu jedem Ansatz 70  $\mu$ l ATP-Lösung (10 nM) hinzugegeben und mit den Beads vermischt. Die Reaktionsansätze wurden dann für 30 min auf Eis im Dunkel inkubiert und dabei alle 10 min durchmischt, um ein Verkleben der Beads zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die Beads magnetisch fixiert und der ATP-haltige Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. In je ein frisches Reaktionsgefäß wurden je 450  $\mu$ l zuvor zubereitetes Reaktions-Mix (enthält alle Komponenten für die Luziferase-

Reaktion, außer ATP) vorgelegt. Zu jedem Mix wurden je 50 µl der ATP-haltigen Überstände hinzugegeben, gemischt und für 15 Minuten im Dunkel inkubiert. Danach wurden die Proben mit Hilfe eines Luminometers in Dreifachbestimmung gemessen. Im Anschluss an diese Messungen wurde mit der ATP-Lösung eine Verdünnungsreihe erstellt (20 nM, 10 nM, 7,5 nM, 5 nM, 2,5 nM und 1 nM) erstellt und je 50 µl jedes Ansatzes mit 450 µl Reaktions-Mix versetzt, 15 min im Dunkel inkubiert und ebenfalls in Dreifachbestimmung im Luminometer gemessen. Dabei ist zu beachten, dass die finale Konzentration an ATP im Reaktions-Mix jeweils ein zehntel der Ausgangslösung beträgt. Dies gilt auch für die Reaktionsansätze, die mit Protein inkubiert wurden. Die Kalibriergerade diente in diesem Fall hauptsächlich als Kontrolle für die verwendeten Assay-Komponenten und das Reaktions-Mix. Als weitere Kontrollen wurde 70 µl der ATP-Lösung (10 nM) im Assay mitgeführt, um die Hydrolyse von ATP unter den Versuchsbedingungen zu simulieren. Eine weitere Kontrolle waren 70 µl Ni-NTA-Beads, die nicht mit Proteinlösung vorinkubiert wurden, aber ansonsten in allen Versuchsschritten mitgenommen wurden und die ebenfalls mit ATP inkubiert wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression und Aufreinigung

#### 4.1.1 Expression der cry1 PHR Domänen

Zur *in-vitro* Analyse der cry1 PHR Domänen in Belichtungs- und Bindungsversuchen wurden die Proteine wie unter 3.2.1.1 beschrieben exprimiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Bakterienpellets bei -80°C gelagert.

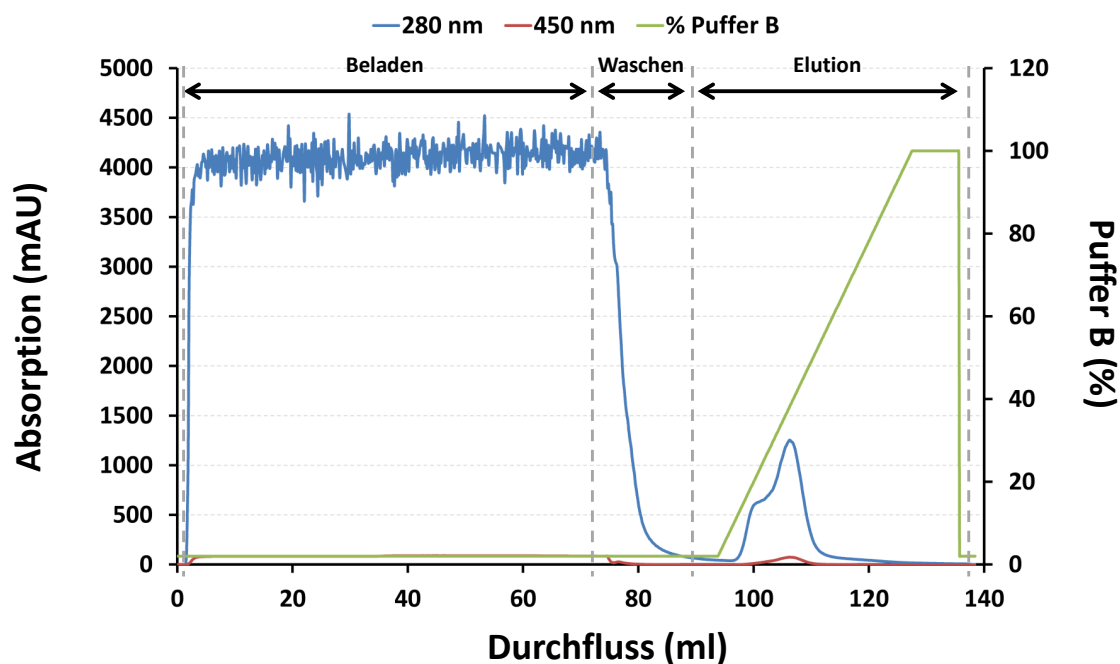
#### 4.1.2 Aufreinigung cry1 PHR Domänen

Für die Aufreinigung der cry1 PHR Domänen wurde das Lysat von Zellpellets aus 18 L Expressionskultur verwendet. Alle Arbeitsschritte zwischen Zell-Lyse und Lagerung der Proteinlösungen bei -80°C wurden unter Sicherheitsrotlicht durchgeführt.

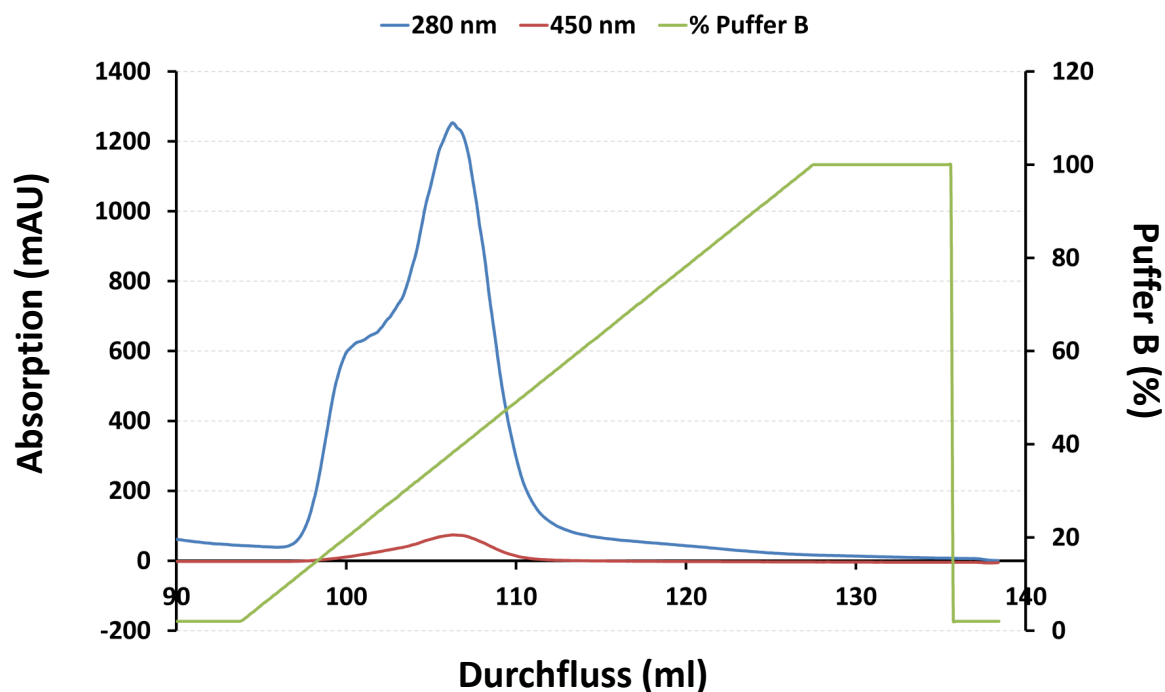
##### 4.1.2.1 Ni-NTA Chromatographie

Während die Proteine wie unter 3.2.10.1 über die Ni-NTA Chromatographie aufgereinigt wurden, wurde der Aufreinigungsprozess chromatographisch überwacht und aufgezeichnet. Hierbei wurden im Wesentlichen folgende Parameter überwacht: Absorptionswerte bei 280 und 450 nm, die Imidazolkonzentration des Elutionspuffers, die Leitfähigkeit der Pufferlösungen und die Fraktionierung des Fraktionskollektors. Alle erhaltenen Werte wurden in einem Übersichtsdiagramm dargestellt: Ein beispielhaftes Diagramm des Verlaufs einer Ni-NTA-Aufreinigung eines cry1 PHR Proteins ist in Abb. 22 dargestellt.





**Abb. 22. Exemplarischer Verlauf einer Ni-NTA Aufreinigung von *cryIL407F* PHR.** Die Wesentlichen Schritte der Ni-NTA Aufreinigung: Beladen der Säule mit Zell-Lysat, Waschen der Säule, um ungebundene Proteine zu entfernen und die Elution der gereinigten Proteine. Das Diagramm zeigt den Absorptionsverlauf der Aufreinigung bei 280 nm (blau) und 450 nm (rot). Weiterhin wird die Konzentration des Elutionspuffers in % auf der Sekundärachse angezeigt (grün). Es wurde eine 1 ml HisTrap crude Säule von GE Healthcare benutzt.

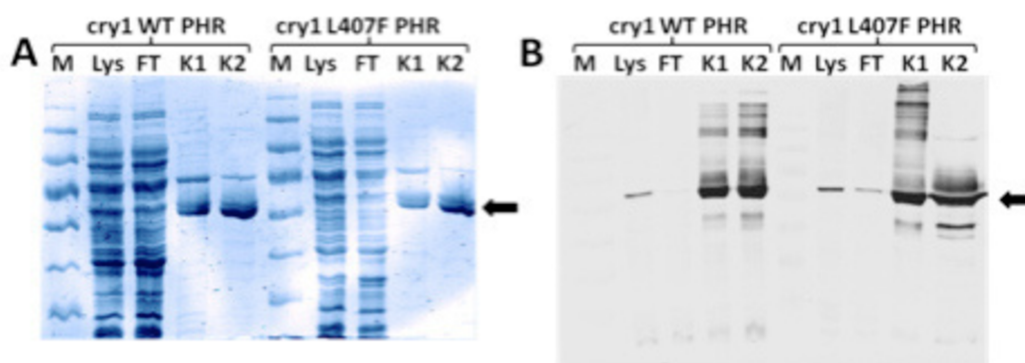


**Abb. 23 Ausschnitt dem Elutionsprofil von *cryIL407F* PHR.** Gezeigt werden der Elutionspeak von *cryIL407F* PHR (blau), der Absorptionspeak bei 450 nm (rot) und der lineare Elutionspuffergradient (grün). Es ist deutlich zu sehen, dass der Elutionspeak eine deutlich ausgeprägte Schulter besitzt. Die Absorptionszunahme bei 450 nm ist auf proteingebundenes oxidiertes FAD zurückzuführen. Der Hauptpeak der Proteinfraction und das Maximum der Absorption bei 450 nm verlaufen parallel. Benutzt wurde eine 1 ml HisTrap crude Säule von GE Healthcare.

Betrachtet man die Abbildungen Abb. 22 und Abb. 23, so wird deutlich, dass das Zielprotein mit steigender Imidazolkonzentration eluiert, wobei sich ein Hauptpeak mit einer ausgeprägten Schulter detektieren lässt. Die Absorption bei 450 nm lässt auf oxidiertes FAD schließen. Die Absorption bei 280 nm und die Absorption bei 450 nm nehmen parallel an Intensität zu. Auch die Maxima beider Kurven fallen zusammen.

Zur genaueren Analyse des Reinigungsprozesses wurden eine SDS-PAGE und ein Western Blot folgender Fraktionen durchgeführt: Zell-Lysat, Säulendurchfluss, Konzentrat des Vor-Peaks und Konzentrat des Hauptpeaks. Eine exemplarische Dokumentation einer Ni-NTA Aufreinigung ist in Abb. 24 dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zell-Lysate sowohl bei Nachweis im Coomassie-Gel als auch in der immunologischen Detektion die heterolog exprimierten Proteine enthalten (Bande zwischen 48 und 63 kDa). Durch die Ni-NTA-Chromatographie werden diese im Säulendurchfluss (FT) deutlich abgereichert. Im Falle der *cry1* WT PHR sogar bis unter die immunologische Nachweisgrenze. Der Säulendurchfluss von *cry1*L407F PHR enthält noch eine nachweisbare Menge an rekombinantem Protein. Vergleicht man die Coomassie Gele mit



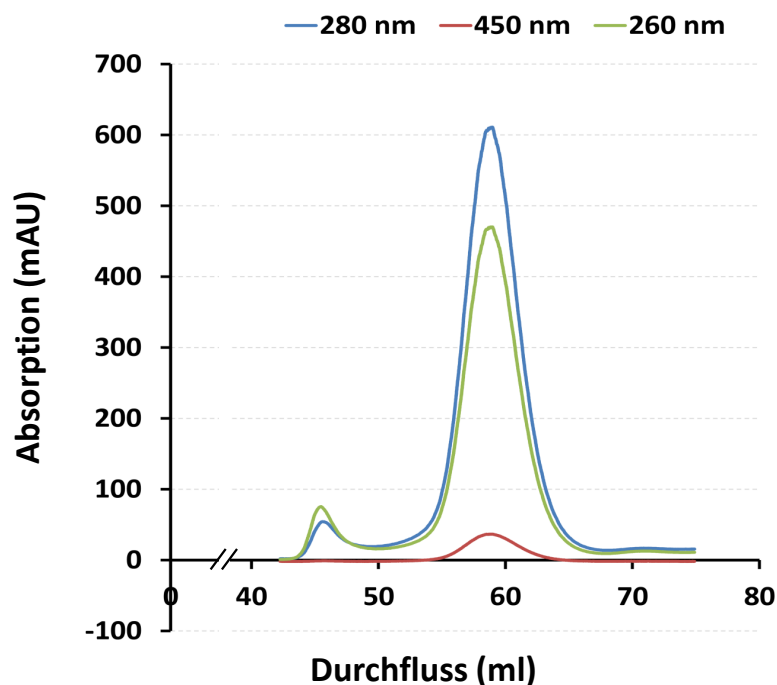
**Abb. 24. Exemplarisches Ergebnis nach der Aufreinigung der *cry1* WT PHR und *cry1* L407F PHR.** (A) Coomassie-gefärbtes SDS Gel. (B) Immunologischer Nachweis der rekombinanten Proteine über Anti-His-Antikörper. Sowohl Coomassie-Gel als auch Western Blot wurden mit dem Licor Odyssey System eingescant. M, Proteinmarker; Lys, Zellysat; FT, Säulendurchfluss; K1, Konzentrat des Pre-Peaks; K2, Konzentrat des Pools aller Fraktionen des Hauptpeaks. Es wurden jeweils 10 µg Protein für Lys und FT aufgetragen. Für K1 und K2 wurden je 5 µg Protein verwendet. Die Pfeile zeigen das Zielprotein

den Immunodetektionen, ist in den Coomassie-gefärbten Gelen bei den aufkonzentrierten Fraktionen K1 und K2 jeweils noch eine zusätzliche prominente Bande im Bereich von etwa 60 kDa zu sehen. Diese Bande ist besonders im Vor-Peak K1 vorhanden. Da diese Bande nicht im erwarteten Größenbereich des Zielproteins liegt, handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine Kontamination durch das Wirtszellenchaperon HSP60. In den Pools der

Hauptpeakfraktionen K2 kann sie im Falle von cry1WT PHR zumindest etwas, im Falle von *cry1L407F* PHR fast ganz abgereichert werden. Diese Bande wird im Western Blot nicht detektiert. Dafür zeigen die Western Blots besonders in den Pre-Peak Fraktionen K1 beider Proteine, aber auch in der Hauptpeakfraktion K2 von cry1WT PHR, höhermolekulare Banden, die durch den Anti-His Antikörper unspezifisch detektiert werden.

#### 4.1.2.2 Präparative Gelfiltration

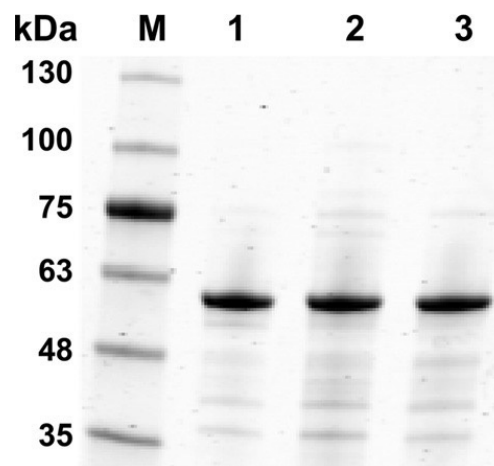
Zur Entfernung der hochmolekularen Verunreinigungen in den Konzentraten der rekombinanten Proteine wurde eine präparative Gelfiltration durchgeführt. Zur Überwachung der Gelfiltration wurde die Absorption bei 280 nm, 450 nm und 260 nm gemessen. In den Chromatogrammen der Gelfiltration konnten zwei Peaks relativ gut separiert werden. Der erste Peak enthielt die rekombinanten Proteine, aber auch eine starke Verunreinigung mit der unter 4.1.2.1 beschriebenen Bande bei ca. 60 kDa, bei der es sich sehr wahrscheinlich um das Chaperon HSP60 aus *E. coli* handelt. Auch war auffällig, dass der erste Peak eine höhere Absorption bei 260 nm als bei 280 nm aufwies. Der zweite Peak enthielt größtenteils nur das



**Abb. 25. Exemplarischer Verlauf einer präparativen Gelfiltration der cry1 PHR Proteine.** Gezeigt werden der Absorptionsverlauf bei 260 nm (grün), 280 nm (blau) und 450 nm (rot). Es werden zwei Peaks separiert, wobei der erste, flächenmäßig kleinere Peak, deutlich höhere Absorption bei 260 nm als bei 280 nm aufweist. Auch die Absorption bei 450 nm befindet sich bei diesem Peak unterhalb der Nachweißgrenze des Detektors. Der Hauptpeak zeigt ein Absorptionsmaximum bei 450 nm.

rekombinante Protein (Daten nicht gezeigt). Während der Gelfiltration erfolgte auch eine Entfernung des im Ni-NTA- Eluat enthaltenem Imidazols. Des Weiteren wurde der Puffer je nach weiterer Anwendung durch SEC-Puffer (10mM Tris/Cl, pH 8.0; 200 mM NaCl) oder SEC+-Puffer (10mM Tris/Cl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 10% Glycerin (w/v)) ausgetauscht (siehe Abb. 25).

Eine SDS-PAGE Analyse der gepoolten und anschließend aufkonzentrierten Fraktionen des zweiten Gelfiltrationspeaks zeigte eine deutliche Verbesserung der Reinheit der rekombinanten Proteine durch Abreicherung von Kontaminationen im hochmolekularen Bereich (siehe Abb. 26).



**Abb. 26. Coomassie-gefärbte SDS-PAGE mit Proben nach der Gelfiltration.** Abgebildet sind die Konzentrate der gepoolten Fraktionen des zweiten Gelfiltrationspeaks. Das Gelbild veranschaulicht sehr gut, dass die Reinheit der rekombinanten Proteine durch die präparative Gelfiltration deutlich verbessert werden konnte. M, Proteinmarker; 1, cry1 WT PHR; 2, cry1 L407F PHR; 3, cry1 Y402A. *Veränderte Abbildung nach (Orth et al., 2017)*

## 4.2 UV/Vis Spektroskopie der PHR-Domänen von cry1WT und cry1L407F

### 4.2.1 Überprüfung der FAD-Bindung

Um festzustellen, ob die aufgereinigten photosensorischen PHR-Domänen von cry1WT und der cry1L407F Mutante den Kofaktor FAD gebunden haben, wurden nach der Aufreinigung jeweils UV/Vis Spektren im Bereich von 220-700nm aufgenommen.

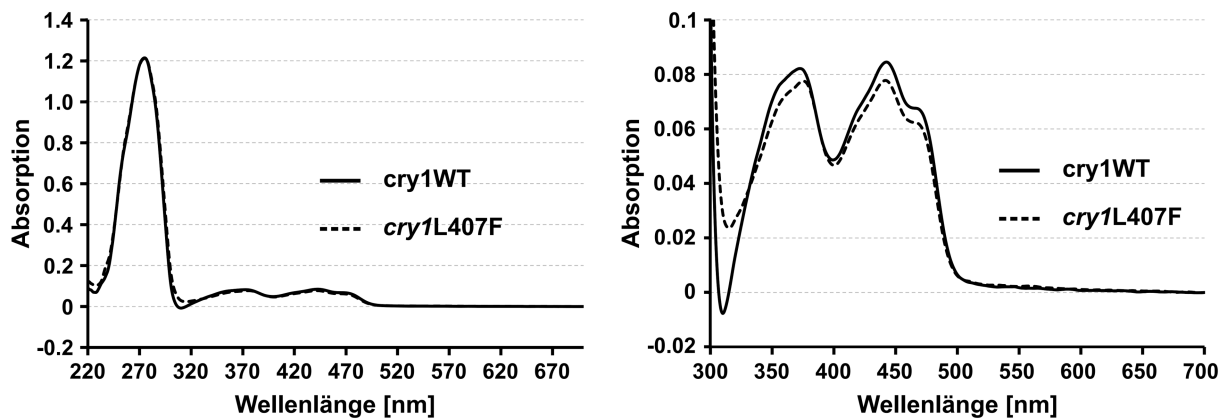


Abb. 27. Bindung des FAD-Kofaktors bei *cry1* WT und *cry1* L407F. Die UV/Vis-Spektren von 10  $\mu$ M Proteinlösungen von *cry1* WT und *cry1*L407F wurden nach Aufreinigung und Ankonzentrierung gemessen. Zu sehen sind das komplett gemessene Spektrum von 220-700 nm (*links*) und eine Vergrößerung des Bereiches von 300-700 nm (*rechts*).

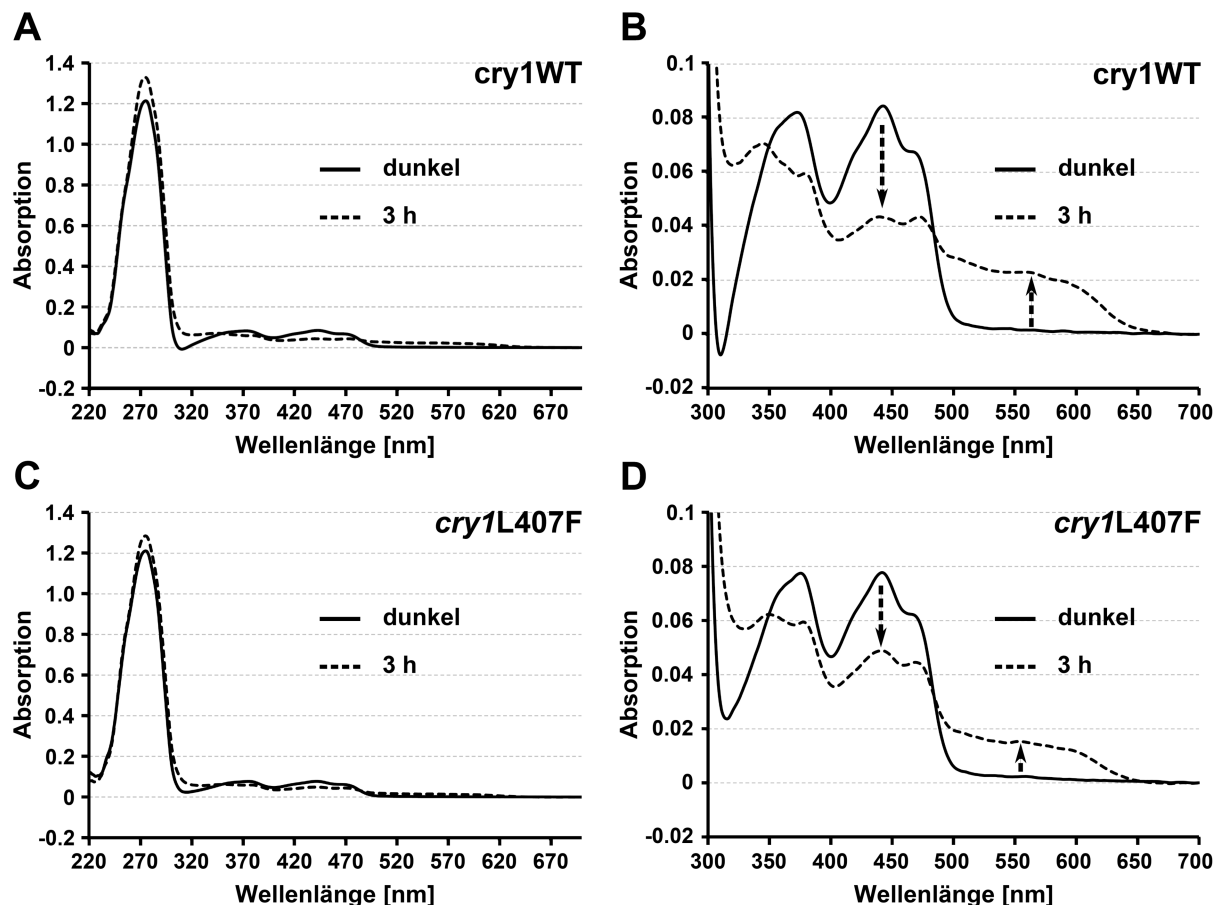
Im UV/Vis-Spektrum (Abb. 27, *links*) sind bei beiden Proteinen jeweils lokale Maxima (*peaks*) bei 280 nm, 370 nm und 450 nm zu erkennen. Bei höherer Auflösung der Spektren im Bereich von 300-700 nm (Abb. 27, *rechts*) wird deutlich, dass das Maximum bei 450 nm eine Feinstruktur mit einem Peak mit zwei ausgeprägten Schultern aufweist. Für den Kofaktor FAD sind im vollständig oxidierten Zustand Absorptionsmaxima bei 370 nm und 450 nm charakteristisch. Durch die Anbindung des FAD Kofaktors an das Apoprotein werden die Absorptionseigenschaften des Kofaktors modifiziert, sodass die charakteristische dreigipflige Feinstruktur im Bereich von 400-500 nm entsteht. Die Schulter am Peak bei 370 nm wird ebenfalls durch die Proteinumgebung hervorgerufen. Die hohe Absorption bei 280 nm wird durch aromatische Aminosäuren des Proteins verursacht und zeigt somit den Proteingehalt der gemessenen Lösung an.

#### 4.2.2 Konversion des FAD-Kofaktors durch Belichtung mit Blaulicht und Dunkelreversion

Für den weiteren Verlauf der geplanten Experimente war es entscheidend, dass das Holoprotein funktionsfähig ist. Einen Hinweis auf die korrekte Funktionalität der Cryptochrome liefert die lichtgetriebene Konvertierbarkeit des FAD-Kofaktors in verschiedene Redoxzustände. Bei einem funktionsfähigen Cryptochrom kann beispielsweise unter Belichtung mit Blaulicht in Gegenwart eines externen Elektronendonors der Übergang von der vollständig oxidierten Form des FAD ( $\text{FAD}_{\text{ox}}$ ) zum neutralen Semichinon  $\text{FADH}^\bullet$

spektroskopisch beobachtet werden. Wird die Belichtung gestoppt und die Proteinlösung verbleibt im Dunkel, findet bei funktionalen Proteinen eine Rückbildung des  $\text{FADH}^\circ$  zur vollständig oxidierten Form  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  statt. Diese Interkonversion verschiedener Redoxzustände des FAD-Kofaktors zeigt an, dass die Proteine photochemisch aktiv sind und ist Voraussetzung für die biologische Funktionalität des Photorezeptors.

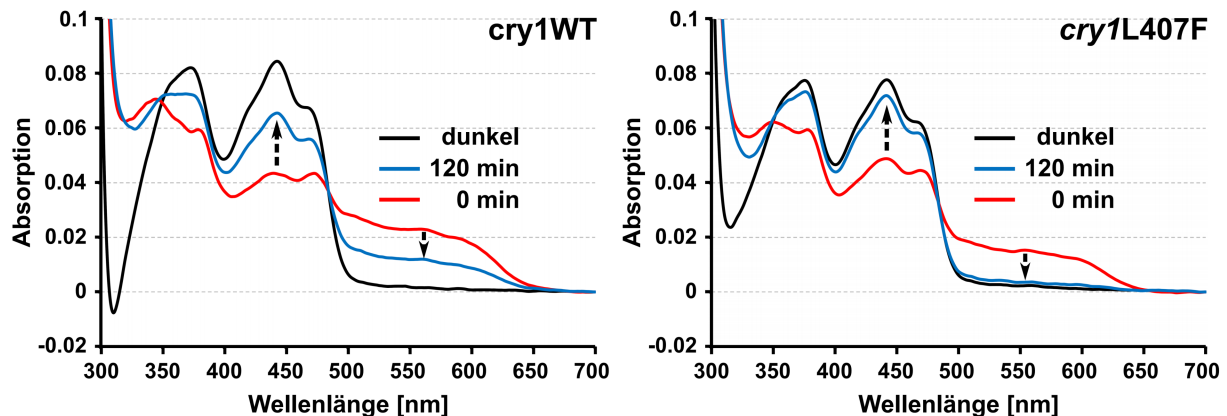
In Abb. 28 sind Belichtungsexperimente an den aufgereinigten photosensorischen Domänen von *cry1WT* und *cry1L407F* gezeigt. Zu sehen ist jeweils ein Spektrum, das den Dunkelzustand der Proteinlösung vor Belichtung zeigt (*dunkel*) und ein Spektrum nach 3 h Belichtung mit Blaulicht (3 h). Die Experimente wurden unter Sicherheitsrotlicht bei einer Küvetten-Temperatur von 10 °C durchgeführt.



**Abb. 28. Photoreduktion des FAD-Kofaktors von *cry1WT* und *cry1L407F*.** Durch Blaubelichtung bei  $450 \pm 5$  nm ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Gegenwart eines externen Reduktionsmittels (20 mM DTT) können die FAD-Kofaktoren beider Proteine reduziert werden. Dafür wurden 10  $\mu\text{M}$  Proteinlösungen für 3 h belichtet und UV/Vis-Spektren von 220-700 nm aufgenommen (A, C). Zur besseren Übersicht wurde der Bereich von 300-700 nm vergrößert dargestellt (B, D). Die lichtinduzierten Veränderungen des Absorptionsspektrums in diesem Bereich sind durch Pfeile verdeutlicht.

Um sicherzustellen, dass die Proteine durch die Lichteinwirkung nicht zerstört wurden, wurden zusätzlich noch UV/Vis-Spektren der Dunkelreversion aufgenommen. Dazu wurden

die Proteinlösungen im Dunkel im Photometer belassen und zu bestimmten Zeitpunkten deren Absorptionsspektren im Bereich von 220-700 nm gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 29 gezeigt. Hier werden die Spektren vor Beginn der Belichtung (*dunkel*), die Spektren nach 180 min Belichtung bzw. 0 min Dunkelreversion (*0 min*) und die Spektren nach 120 min Dunkelreversion (*120 min*) miteinander verglichen. Die Zunahme der Absorption bei 450 nm und der Rückgang der Absorption bei 560 nm sind durch Pfeile gekennzeichnet.



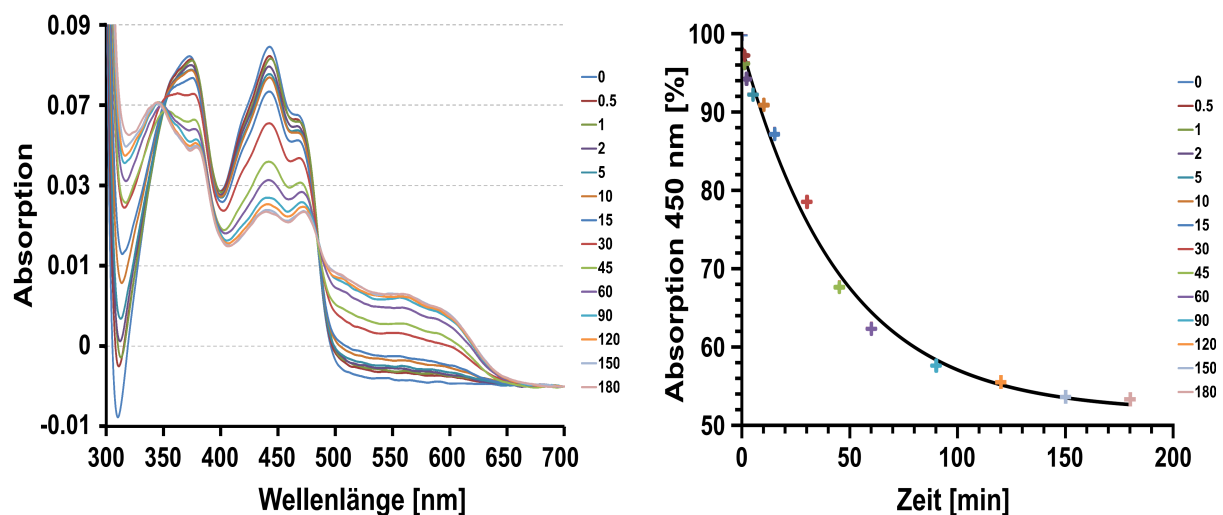
**Abb. 29. Dunkelreversion der FAD-Kofaktoren von cry1WT und cry1L407F.** Mit Blaulicht für 120 min belichtete Lösungen beider Proteine (*rote Linien*) wurden für 120 min im Dunkel belassen (*blaue Linien*). Dabei nähern sie sich den Spektren der Dunkelproben (*schwarze Linien*) an. Die Rückbildung der Spektren ist durch Pfeile dargestellt. Die Photoreduktion des Kofaktors ist somit reversibel.

Die Graphen *A* und *B* zeigen die Photoreduktion des FAD-Kofaktors von cry1WT, wobei in *A* das komplette gemessene UV/Vis-Spektrum abgebildet wird und in *B* ein vergrößerter Ausschnitt des Spektralbereiches von 300-700 nm dargestellt ist. In dem vergrößerten Bereich kann man sehen, dass durch die Blaubelichtung die Absorption des  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  abnimmt und gleichzeitig die Absorption bei 560 nm zunimmt. Im Verlauf der Belichtung nimmt die Absorption bei 450 nm kontinuierlich ab (*angezeigt durch Pfeil*) bis nach 3 h schließlich weniger als 50% der Ausgangsabsorption vorhanden ist. Die Absorptionsabnahme bei 450 nm spricht für eine Abnahme der Anfangsmenge von  $\text{FAD}_{\text{ox}}$ . Die kontinuierliche Zunahme der Absorption bei 560 nm repräsentiert die Akkumulation von  $\text{FADH}^\circ$ . Der Übergang zwischen den beiden Redoxzuständen wird durch einen Isosbestischen Punkt bei ca. 490 nm angezeigt. Die cry1L407F Mutante (Abb. 28 C, D) verhält sich bei Blaubelichtung qualitativ ähnlich wie der Wildtyp. Auch hier zeigt ein kontinuierlicher Rückgang der Absorption bei 450 nm die Abnahme der Ausgangsmenge an  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  an, wobei eine Zunahme der Absorption bei 560 nm auch hier für die Akkumulation des neutralen Semichinons  $\text{FADH}^\circ$  spricht. Auch hier ist ein isosbestischer Punkt bei 490 nm vorhanden. Die Absorption bei 450 nm geht durch die Belichtung über 3 h auf ca. 60% zurück.

Abb. 29 zeigt, dass sowohl cry1WT als auch *cry1L407F* eine Dunkelreversion durchlaufen. Das während der Belichtung gebildete  $\text{FADH}^\circ$  bildet sich zu  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  zurück, was sich in der Abnahme der Absorption bei 560 nm und eine entsprechende Zunahme der Absorption bei 450 nm widerspiegelt. Beim Wildtyp-Protein verbleiben nach 120 min Dunkel noch etwa 50% der Absorption vom Ende der Belichtung. Bei *cry1L407F* dagegen erreicht die Absorption bei 560 nm beinahe wieder den Ausgangszustand.

#### 4.2.3 Kinetiken der FAD-Photokonversion von cry1WT und *cry1L407F*

Um die Konversionsraten von  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  zu  $\text{FADH}^\circ$  bei cry1WT und cry1L407F quantitativ vergleichen zu können, wurden während der Belichtung der Proteinlösungen über einen Zeitraum von 3 h regelmäßig UV/Vis-Spektren im Bereich von 220-700 nm aufgenommen. Die gemessenen Spektren und die daraus abgeleitete Kinetik ist in Abb. 30 am Beispiel von cry1WT dargestellt. Neben dem Vergleich der Photoreduktionskinetiken von cry1WT und *cry1L407F* (Abb. 31) sollten darüber hinaus noch die Effekte der Nukleotide ATP, ADP, AMP-PNP, NADP und NADPH getestet werden.



**Abb. 30. Kinetik der Photoreduktion von cry1WT.** Eine 10  $\mu\text{M}$  Proteinlösung von cry1WT wurde in Gegenwart von 20 mM DTT für 180 min mit Blaulicht ( $450 \pm 5 \text{ nm}$ ;  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) bestrahlt. UV Vis-Spektren von 220-700 nm wurden nach 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, und 180 min Belichtung gemessen. Der Bereich des Spektrums von 300-700 nm (*links*) zeigt die lichtabhängigen Veränderungen im Absorptionsspektrum des FAD-Kofaktors während der Belichtung. Die Absorption bei 450 nm zu den Messzeitpunkten ist als Graph prozentual dargestellt (*rechts*). Dabei wurde die Absorption bei 450 nm zum Zeitpunkt 0 min als 100%  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  angenommen. Mit Hilfe der Software *qti-Plot* konnte durch einen Fit mit einer Exponentialfunktion (*schwarze Linie*) die Halbwertszeit von  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  rechnerisch ermittelt werden.



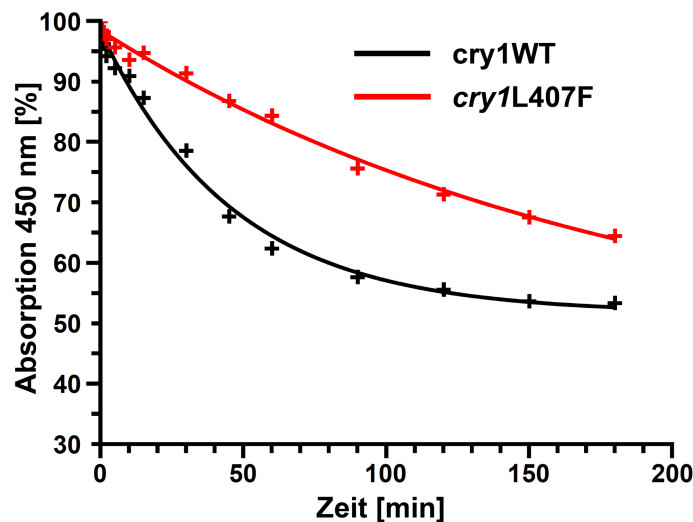


Abb. 31. Vergleich der Photoreduktionskinetiken von cry1WT PHR und cry1L407F PHR ohne Zugabe von Nukleotiden

Hierzu wurden die Kinetiken der Photoreduktion beider Proteine wie in Abb. 30 gezeigt und beschrieben erstellt in Anwesenheit der oben aufgeführten Nukleotide in einer Endkonzentration von 1 mM. Die Ergebnisse aller Messungen sind in Abb. 32 zusammengestellt. Der Übersichtlichkeit halber werden hier lediglich die aus den Messwerten abgeleiteten Kinetiken gezeigt.

Zur besseren optischen Vergleichbarkeit wurden in jeder Teilabbildung in Abb. 32 noch zusätzlich die Kinetiken der getesteten Proteine ohne Zugabe von Nukleotiden (siehe Abb. 31) als schwarze Linien eingefügt. Aufgrund der erhobenen Daten scheinen die Nukleotide ATP, ADP und AMP-PNP die Photoreduktion von cry1WT PHR zu beschleunigen. Hierbei haben ATP und ADP durchgängig starken Einfluss auf die Kinetik der Photoreduktion. Das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PNP zeigt nur in den ersten 20 min der Belichtung einen starken Effekt, der jedoch im Verlaufe der Belichtungsdauer abnimmt. Zusätzlich ist auffällig, dass der Fit für die Kinetik der Belichtung von cry1WT PHR ohne Zugabe von Nukleotiden mit einer einzigen Halbwertszeit angegeben werden kann (Fit erster Ordnung). In Gegenwart von ATP, ADP und AMP-PNP jedoch musste jeweils ein Fit mit zwei Zeitkomponenten angenommen werden (Fit zweiter Ordnung). Wie auch in Tabelle 1 zu sehen ist, ist die Photoreduktion in Gegenwart dieser wirksamen Substrate auf zwei Zeitkonstanten und dementsprechend zwei Reaktionen aufgeteilt: Eine schnell ablaufende Reaktion und eine langsam ablaufende Reaktion.

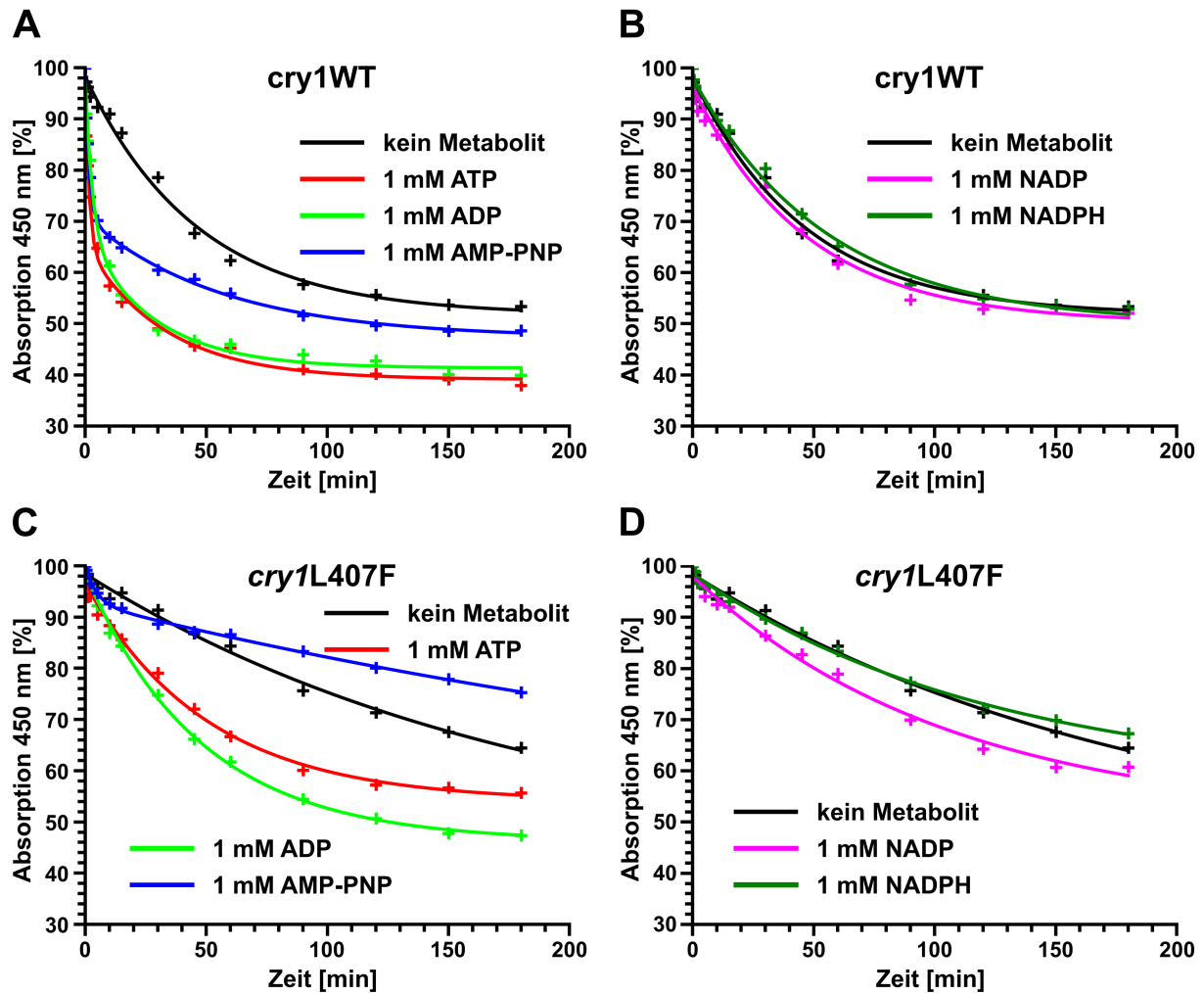


Abb. 32. Kinetiken der Photoreduktion von *cry1WT* und *cry1L407F* im Vergleich. Die Abgebildeten Kinetiken der Photoreduktion von *cry1WT* und *cry1L407F* wurden in Abwesenheit (*schwarze Linien*) und Anwesenheit von Nukleotiden (*farbige Linien*) durchgeführt. Die Kinetiken wurden wie in Abb. 30 gezeigt und beschrieben erstellt. Zur Vergleichbarkeit wurde in jedem Graph als Referenz die entsprechende Kinetik ohne Nukleotid eingefügt (*schwarze Linien*).

Protein	Nukleotid	Fit Ordnung	R <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> [min]
cry1 WT	---	1	0.9935	31.47 ± 2.65
cry1 WT	1 mM ATP	2	0.9978	t <sub>1</sub> = 18.67 ± 2.23 t <sub>2</sub> = 0.94 ± 0.12
cry1 WT	1 mM ADP	2	0.9953	t <sub>1</sub> = 26.93 ± 3.22 t <sub>2</sub> = 1.36 ± 0.17
cry1 WT	1 mM AMP-PNP	2	0.9984	t <sub>1</sub> = 38.32 ± 2.32 t <sub>2</sub> = 1.05 ± 0.05
cry1WT	1 mM NADP	1	0.9912	31.73 ± 3.13
cry1WT	1 mM NADPH	1	0.9955	37.15 ± 2.78
<i>cry1L407F</i>	---	1	0.9947	99.10 ± 15.32
<i>cry1L407F</i>	1 mM ATP	1	0.9962	34.75 ± 2.31
<i>cry1L407F</i>	1 mM ADP	1	0.9986	31.52 ± 1.23
<i>cry1L407F</i>	1 mM AMP-PNP	2	0.9995	t <sub>1</sub> = 120.69 ± 13.40 t <sub>2</sub> = 2.04 ± 0.26
<i>cry1L407F</i>	1 mM NADP	1	0.9949	72.19 ± 8.50
<i>cry1L407F</i>	1 mM NADPH	1	0.9977	80.72 ± 6.95

**Tab. 1. Auswertung der Kinetiken der Photoreduktion von cry1WT PHR und *cry1L407F* PHR.** Spalte 1 führt das getestete Protein auf. In Spalte 2 ist das zugesetzte Nukleotid und dessen Konzentration angegeben. Die Ordnung des besten Fits der Messpunkte ist in Spalte 3 aufgeführt. Das Bestimmtheitsmaß des Fits ist Spalte 4 zu entnehmen. Die aufgrund des Fits extrapolierten Halbwertszeiten sind in Spalte 5 aufgelistet.

Die Nukleotide NADP und NADPH haben keinen Einfluss auf die Photoreduktion von cry1WT PHR. Die Kurven der Kinetiken verlaufen nahezu exakt gleich wie die Kurve der Photoreduktion von cry1WT PHR ohne Zugabe eines Nukleotids.

Bei Betrachtung der Kinetiken der Photoreduktion der *cry1L407F* PHR fällt auf, dass auch hier die Nukleotide ATP und ADP eine beschleunigende Wirkung auf die Photoreduktion haben. Das Substrat AMP-PNP dagegen scheint keinen steigernden Effekt zu haben. Es scheint im Gegenteil die Photoreduktion noch zu verlangsamen. Interessanterweise war hier auch nur ein Fit zweiter Ordnung möglich, d.h. in Gegenwart von AMP-PNP scheint sich die Photoreduktion von *cry1L407F* PHR in eine schnell ablaufende und eine langsam ablaufende

Reaktion aufzuteilen. Die Nukleotide NADP und NADPH scheinen vom Verlauf der Graphen keine Wirkung auf die Photoreduzierbarkeit von *cry1L407F* PHR zu haben. Schaut man aber auf die abgeleiteten Halbwertszeiten, so wird deutlich, dass diese Nukleotide die Photoreduktion verlangsamen.

#### 4.2.4 Kinetiken der FAD-Dunkelreversion von *cry1WT* und *cry1L407F*

Bei der Auswertung der Daten der Dunkelreversionen war es unter bloßer Verwendung der Rohdaten nicht möglich, einen passenden Fit zu ermitteln. Daher wurden die bei 450 nm ermittelten Absorptionswerte um die Absorptionswerte des Semichinons FADH<sup>°</sup> bei 450 nm mit Hilfe der jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten korrigiert. Die hierfür verwendeten molaren Extinktionskoeffizienten wurden aus Müller et al., 2015 entnommen.

$$\text{FAD}_{\text{ox}} \varepsilon_{450} = 11\,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (Müller et al., 2015)}$$

$$\text{FADH}^{\circ} \varepsilon_{560} = 4\,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (Müller et al., 2015)}$$

$$\text{FADH}^{\circ} \varepsilon_{450} = 5\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (Müller et al., 2015)}$$

Aus den korrigierten Absorptionswerten bei 450 nm konnten die in Abb. 33 gezeigten Graphen erstellt werden. Mit Hilfe der Software *QtiPlot* wurden dann die Halbwertszeiten aus exponentiellen oder linearen Fits errechnet (siehe Tab. 2. Auflistung der Auswertung der Kinetiken der Dunkelreversion von *cry1 WT* PHR und *cry1 L407F* PHR. Spalte 1 führt das getestete Protein auf. In Spalte 2 ist das zugesetzte Nukleotid und dessen Konzentration angegeben. Die Ordnung des besten Fits der Messpunkte ist in Spalte 3 aufgeführt. Das Bestimmtheitsmaß des Fits ist Spalte 4 zu entnehmen. Die aufgrund des Fits extrapolierten Halbwertszeiten sind in Spalte 5 aufgelistet.

).

Die Halbwertszeit der Dunkelreversion von *cry1WT* PHR beträgt etwa 98 min. ATP scheint auf diesen Wert keinen Einfluss zu nehmen.

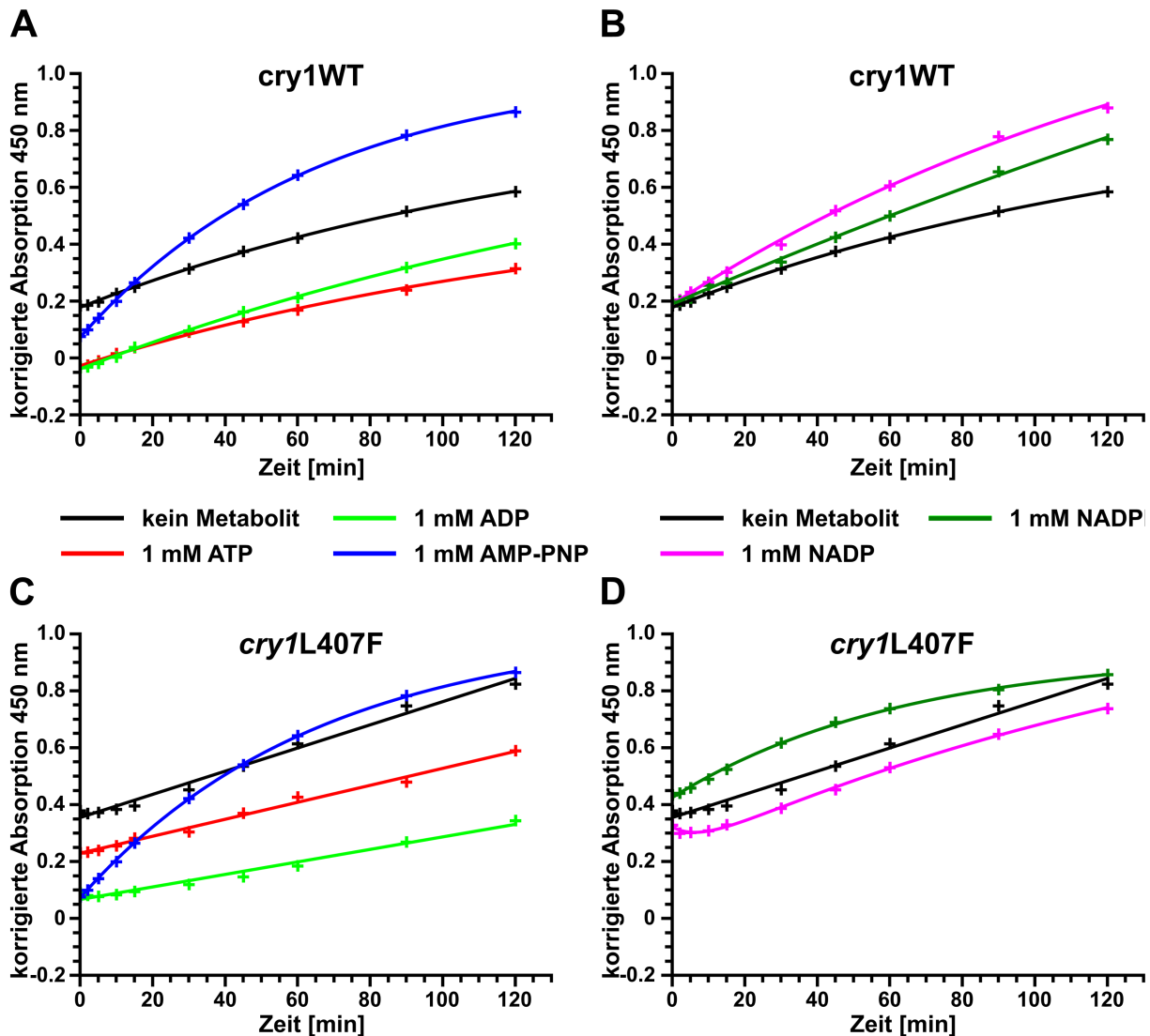


Abb. 33. Vergleich der Kinetiken der Dunkelreversion von *cry1WT* PHR und *cry1L407F* PHR. Die abgebildeten Kinetiken der Dunkelreversion von *cry1WT* und *cry1L407F* wurden in Abwesenheit (*schwarze Linien*) und Anwesenheit von Nukleotiden (*farbige Linien*) durchgeführt. Zur Vergleichbarkeit wurde in jedem Graph als Referenz die entsprechende Kinetik ohne Nukleotid eingefügt (*schwarze Linien*).

AMP-PNP dagegen beschleunigt die Dunkelreversion, während ADP die Dunkelreversion verlangsamt. NADP hat wie auch bei der Photoreduktion keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Dunkelreversion. Im Falle von NADPH ist eine Aussage diesbezüglich kaum möglich, da ein Fit dieses Datensatzes zwar eine Halbwertszeit ausgibt, der angegebene Fehler aber auch sehr groß ist, obwohl der Fit ein Bestimmtheitsmaß von 0.9955 aufweist. Bei der Dunkelreversion von *cry1L407F* dagegen scheinen nur NADPH und AMP-PNP die Reaktion zu beschleunigen. Alle anderen Nukleotide verlangsamen die Dunkelreversion. Im Fall von NADP ist eine Aussage schwierig zu treffen, da auch hier der Fit mit  $R^2 = 0.9986$  zwar relativ gut ist, die ermittelte Halbwertszeit aber durch einen großen Fehler nicht genau angegeben werden kann (siehe Tabelle 2).

Protein	Nukleotid	Fit Ordnung	R <sup>2</sup>	t <sub>½</sub> [min]
cry1 WT	---	1	0.9996	98.11 ± 7.19
cry1 WT	1 mM ATP	1	0.9977	104.37 ± 22.92
cry1 WT	1 mM ADP	1	0.9993	136.63 ± 16.37
cry1 WT	1 mM AMP-PNP	1	0.9999	45.49 ± 0.49
cry1WT	1 mM NADP	1	0.9985	110.01 ± 16.50
cry1WT	1 mM NADPH	1	0.9955	364.05 ± 179.14
<i>cry1</i> L407F	---	linear	0.9879	170.07
<i>cry1</i> L407F	1 mM ATP	linear	0.9926	232.30
<i>cry1</i> L407F	1 mM ADP	linear	0.9785	315.15
<i>cry1</i> L407F	1 mM AMP-PNP	1	0.9998	24.14 ± 0.40
<i>cry1</i> L407F	1 mM NADP	2	0.9986	t <sub>1</sub> = 119.08 ± 48.58 t <sub>2</sub> = 5.07 ± 2.22
<i>cry1</i> L407F	1 mM NADPH	1	0.9986	44.46 ± 2.95

**Tab. 2. Auflistung der Auswertung der Kinetiken der Dunkelreversion von cry1 WT PHR und cry1 L407F PHR.** Spalte 1 führt das getestete Protein auf. In Spalte 2 ist das zugesetzte Nukleotid und dessen Konzentration angegeben. Die Ordnung des besten Fits der Messpunkte ist in Spalte 3 aufgeführt. Das Bestimmtheitsmaß des Fits ist Spalte 4 zu entnehmen. Die aufgrund des Fits extrapolierten Halbwertszeiten sind in Spalte 5 aufgelistet.

### 4.3 Der Einfluss verschiedener Nukleotide auf die Proteinstabilität

Um die Proteinstabilität in Gegenwart von Nukleotiden zu untersuchen, wurden zwei *in-vitro* Techniken angewendet: Die partielle Trypsinierung wurde benutzt, um mögliche konformationelle Änderungen in der Struktur der Proteine durch Nukleotidbindung zu visualisieren. Der Thermo-FAD Assay zeigt anhand der Schmelztemperatur, ob das Protein durch Nukleotidbindung stabilisiert wird. Zudem sollte mittels des Thermo-FAD Assays die Spezifität gegenüber den Basen Adenin (ATP und Derivate), Guanin (GTP), Cytosin (CTP) und Thymin (TTP) untersucht werden.

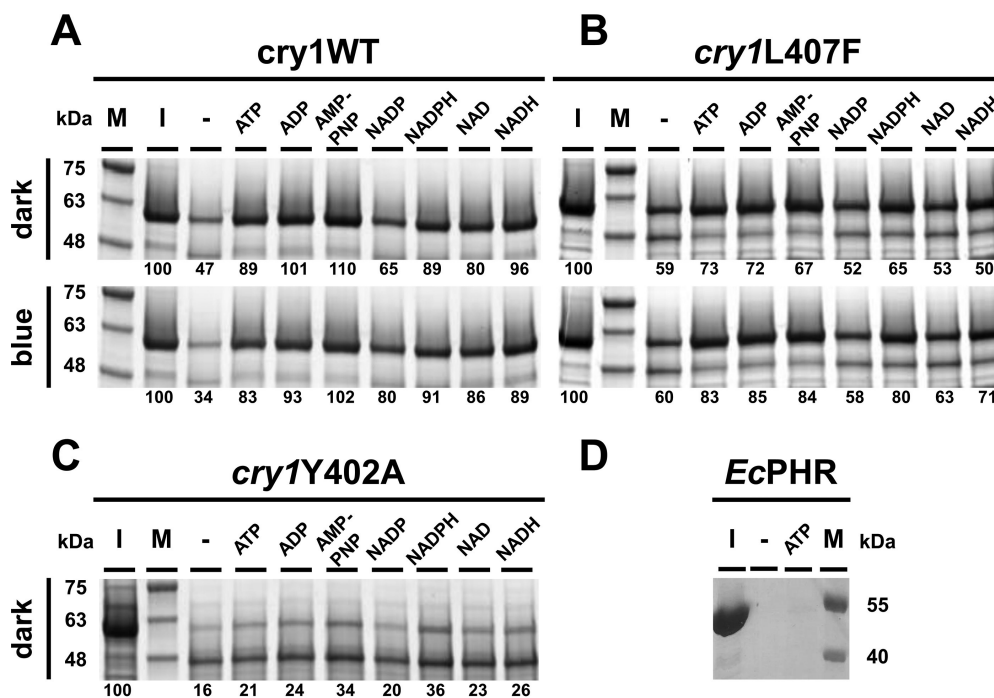
#### 4.3.1 Partielle Trypsinierung

##### 4.3.1.1 Einfluss von Nukleotiden auf die Trypsin-Sensitivität

Bei der partiellen Trypsinierung wurde untersucht, ob durch Bindung verschiedener Nukleotide die Widerstandsfähigkeit der Kernstruktur der Proteine gegenüber der Protease Trypsin erhöht werden kann. Eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Proteolyse deutet darauf hin, dass weniger Trypsinspaltstellen im Protein zugänglich sind oder der Zugang der Protease erschwert wird. Dies kann auf strukturelle Änderungen in der Proteinfaltung hindeuten. Hierzu wurde die Integrität der Hauptbande der Cryptochrome und von Kontrollproteinen nach einer 30 minütigen Trypsinbehandlung gefolgt von SDS-PAGE und Coomassie-Färbung untersucht. Verglichen wurden die durch Trypsin-Behandlung entstandenen Proteinbanden mit einem Standardsignal, welches von der gleichen Menge an Protein ohne Trypsinbehandlung geliefert wurde. Als Kontrolle wurde die Photolyase aus *E. coli* in An- oder Abwesenheit von Nukleotid ebenfalls mit Trypsin behandelt. Die *E. coli* Photolyase eignet sich als Kontrolle, da sie eine hohe strukturelle Homologie zu cry1 PHR aufweist.

Die Quantifizierung der Gelanalyse der Trypsinierung von cryWT PHR bei dunkeladaptierten Proben zeigt, dass in Abwesenheit eines Nukleotids 53% des Proteins durch die Proteasebehandlung abgebaut wurden. Man erkennt deutlich, dass alle verwendeten Nukleotide die Suszeptibilität von cry1WT PHR gegenüber Trypsin herabsetzen, d.h. das Protein wird durch die Bindung stabilisiert: In Gegenwart von ADP und AMP-PNP findet im

Vergleich zur Probe ohne Nukleotid kein Abbau statt. Abbau, allerdings geringern als in der Probe ohne Nukleotid, findet sich dagegen in Gegenwart von NADH, NADPH, ATP und NAD. Den schwächsten Effekt hat NADP, in dessen Gegenwart 35% des Proteins abgebaut werden (siehe Abb. 34 A). Auch bei mit Blaulicht vorbelichteten Proben haben alle Mataboliten einen stabilisierenden Effekt auf cry1 WT PHR. In der Probe mit AMP-PNP findet sich kein Abbau. Schwacher Abbau des Proteins wird dagegen in Gegenwart von ATP, ADP, NADH, NAD, NADP und NADPH festgestellt.



**Abb. 34. Partieller Trypsinabbau von cry1WT PHR, den cry1 Mutanten L407F und Y402A sowie der *E. coli* Photolyase.** Gezeigt wird jeweils ein repräsentatives Coomassie-gefärbtes Gel von drei unabhängigen Replikaten. cry1WT (A), cry1L407F (B), cry1Y402A (C), und *E. coli* photolyase (D). Die Proteinproben in A und B waren entweder dunkeladaptiert (dunkel) oder wurden mit Blaulicht vorbelichtet, bis die Photoreduktion von FAD<sub>ox</sub> abgeschlossen war. Die Proben in C und D wurden nur dunkeladaptiert. Protein Konzentration, 10 µM; Nukleotide Konzentration, 1 mM; Trypsin Konzentration, 10 µM. Die Reaktionen wurden 30 min bei 30°C inkubiert. M, Protein Marker; I, Input; -, kein Nukleotid. Die Proteinbanden wurden eingescannt und mit der Software ImageJ quantifiziert, wobei der Input (I) als 100% gesetzt wurde. Ergebnisse der Quantifizierung sind in % unter jeder Gelspur angegeben.

Bei cry1L407F PHR liegt der Proteinabbau durch Trypsin ohne Zugabe von Nukleotiden sowohl bei dunkeladaptierten als auch bei mit Blaulicht vorbelichteten Proben bei etwa 40%. Bei der cry1L407F Mutante bewirkt der Zusatz der Nukleotide ATP, ADP, AMP-PNP und NADPH eine signifikante Zunahme der Widerstandsfähigkeit gegenüber Trypsin. Die Zugabe von ATP, ADP, AMP-PNP und NADPH verringert den Abbau im Falle der Dunkelproben von 40% auf 27%, 28%, 33% und 35%. Bei vorbelichteten Proben wird die Proteolyse auf 17%, 15%, 16% und 20% verringert. Die Zugabe von NADH senkt den Abbau von



vorbelichtetem *cryIL407F* von 40% auf 29%. Dieser Effekt ist in der Dunkelprobe nicht sichtbar. Die Nukleotide NAD und NADH zeigen im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen ohne Nukleotid sowohl in den Dunkelproben als auch in den vorbelichteten Proben keinen signifikanten Effekt.

Da in der *cryIY402A* Mutante das für die Nukleotidbindung essentielle Tyrosin 402 gegen Alanin ausgetauscht wurde, sollte ein Einfluss dieser Verbindung auf die proteolytische Spaltung stark vermindert, wenn nicht gar komplett unterdrückt sein. Dies zeigt sich in den Ergebnissen der partiellen Trypsinierung von *cryIY402A* PHR. Die Stabilisierung des Proteins durch die Bindung von Nukleotiden, so wie für *cry1WT* beobachtet, bleibt bei dieser Mutante fast gänzlich aus. Im Schnitt werden 75% des Proteins durch Trypsin abgebaut, unabhängig davon, ob Nukleotiden zur Reaktion zugesetzt wurden, oder nicht. Die partielle Trypsinierung von *cryIY402A* PHR wurde nur mit dunkeladaptierten Proben durchgeführt.

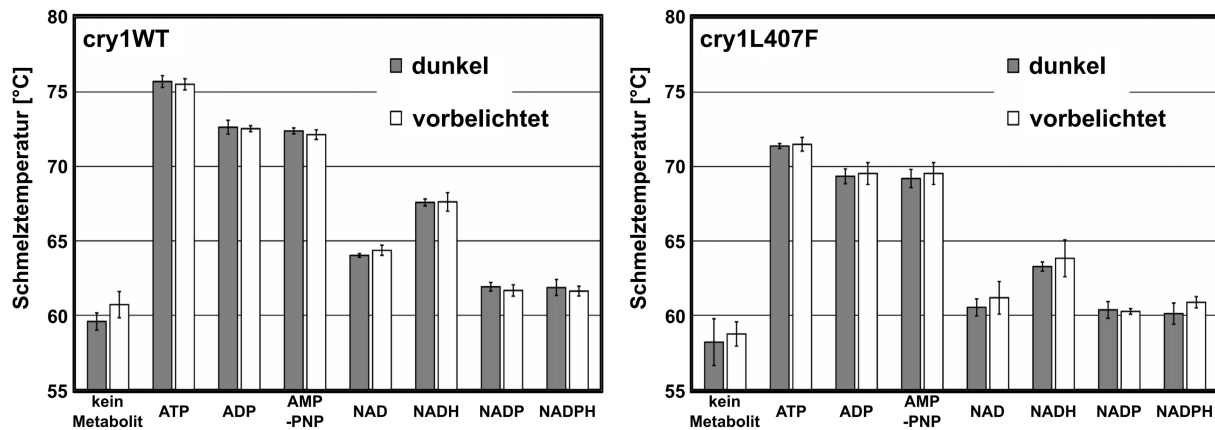
Die partielle Trypsinierung der *E. coli* Photolyase zeigte, dass die Photolyase mit und ohne Zugabe von ATP komplett durch Trypsin abgebaut wird.

#### **4.3.2 ThermoFAD**

Der ThermoFAD Assay wurde angewandt, um die Schmelztemperatur der *cry1* PHR Proteine unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu untersuchen.

##### **4.3.2.1 Schmelzpunktanalyse**

Bei der Schmelzpunktanalyse mittels ThermoFAD wurde untersucht, ob die Gegenwart von Nukleotiden im Reaktionsansatz einen Einfluss auf die Schmelztemperatur von *cry1WT* PHR und *cryIL407F* PHR hat. Hierzu wurden jeweils 1 mM der Nukleotide ATP, ADP, AMP-PNP, NAD, NADH, NADP und NADPH zugesetzt. Proben ohne Zugabe von Nukleotiden dienten hierbei als Kontrolle. Um herauszufinden, ob Licht möglicherweise die Nukleotidbindung und damit auch die Schmelztemperatur beeinflusst, wurden die Experimente mit Proben, die mit Blaulicht vorbestrahlt worden waren Proben und mit dunkeladaptierten Proben durchgeführt. In Abb. 35 sind die Auswertungen der Schmelzpunktanalyse zusammengestellt. Hier werden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von je drei Wiederholungen gezeigt.



**Abb. 35. Schmelzpunktanalyse mittels ThermoFAD.** Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei Wiederholungen. Von cry1 WT PHR (links) und cry1L407F (rechts) wurden jeweils vorbelichtete und dunkeladaptierte Proben miteinander verglichen.

Betrachtet man die Daten von cry1WT PHR und cry1L407F PHR (Abb. 35), so fällt zunächst auf, dass in beiden Fällen die Fehlerindikatoren der vorbelichteten Proben und der dunkeladaptierten Proben in jedem gezeigten Datensatz überlappen, d.h. Licht hat im gewählten Versuchsaufbau keinen signifikanten Einfluss auf die Schmelztemperatur der Proteine. Weiterhin fällt auf, dass beide Datensätze den gleichen Trend bezüglich bestimmter Nukleotide aufweisen. Lediglich NAD zeigt einen unterschiedlich starken Effekt bei beiden Proteinen. Während sich die Schmelztemperatur bei cry1WT PHR in Gegenwart von NAD signifikant von der Schmelztemperatur bei Zugabe von NADP und NADPH unterscheidet, gibt es bei cry1L407F PHR keinen signifikanten Unterschied zwischen den entsprechenden Datensätzen.

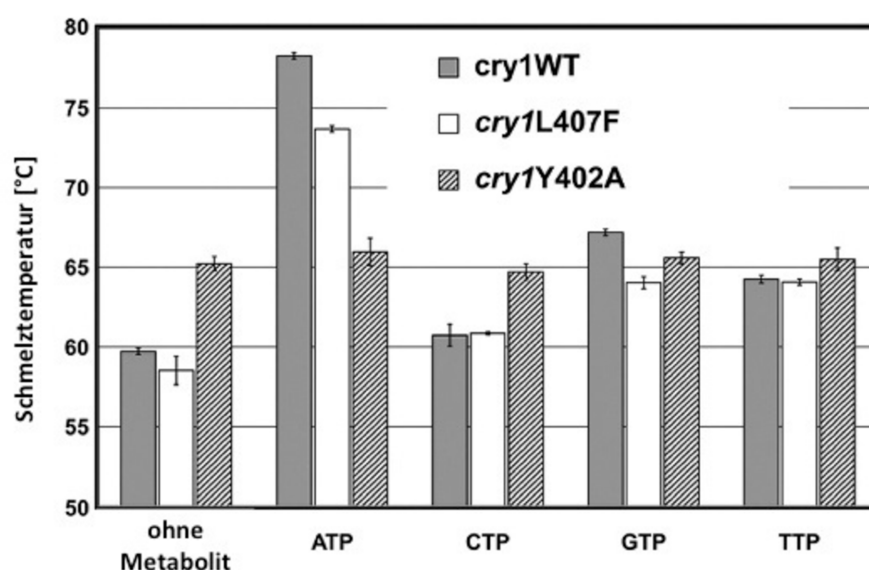
Im Falle von cry1WT PHR liegt der Schmelzpunkt des Proteins ohne Zugabe von Nukleotiden bei etwa 60 °C. Fügt man ATP zu cry1WT PHR hinzu, liegt der Schmelzpunkt bei 75 °C. Die Daten zeigen weiterhin, dass durch Zugabe von ADP und AMP-PNP der Schmelzpunkt von cry1WT PHR von 60 °C auf etwa 73 °C erhöht wird. Durch die Nukleotide NADP und NADPH erhöht sich der Schmelzpunkt von cry1 WT auf etwa 62 °C. Aufgrund der geringen Überlappung der Fehlerindikatoren zu dem Datensatz „cry1 WT PHR ohne Nukleotid; vorbelichtet“ ist es fraglich, ob diese Erhöhung der Schmelztemperatur als signifikant zu betrachten ist. Die Zugabe von NADH dagegen führt zu einer signifikanten Erhöhung des Schmelzpunktes von cry1WT PHR auf etwa 68 °C.

Die Schmelztemperatur von cry1L407F PHR ohne Zugabe von Nukleotiden liegt mit 58 °C etwas niedriger als die entsprechende Schmelztemperatur von cry1 WT PHR. Allerdings überlappen auch hier einige Fehlerbalken, so dass dieser Unterschied in der Schmelztemperatur nicht statistisch abgesichert werden kann. Durch Zugabe von ATP wird

der Schmelzpunkt von *cry1L407F* PHR auf etwa 72 °C erhöht. Wie bereits oben erwähnt, unterscheidet sich die Schmelztemperatur bei Zugabe von NAD, NADP und NADPH im Falle von *cry1L407F* PHR nicht signifikant. Zwar erhöhen alle drei Nukleotide den Schmelzpunkt von *cry1L407F* PHR auf etwa 61 °C, jedoch ist es aufgrund überlappender Fehlerindikatoren mit dem Datensatz „*cry1L407F* PHR ohne Nukleotid“ fraglich, ob diese Erhöhung signifikant ist. ADP und AMP-PNP dagegen führen zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur auf etwa 69 °C. Auch NADH erhöht den Schmelzpunkt von *cry1L407F* PHR signifikant auf etwa 64 °C.

#### 4.3.2.2 Untersuchung der Basenspezifität

Die bisher getesteten Nukleotide ATP, ADP, AMP-PNP, NAD, NADH, NADP und NADPH tragen gemeinsam einen Adeninring. Um herauszufinden, ob der Adeninring oder die Phosphatgruppen an der Bindung der Nukleotide beteiligt ist, wurde in einem weiteren experimentellen Ansatz mittels ThermoFAD die Basenspezifität der Nukleotidbindung der *cry1* PHR Proteine untersucht. Hierzu wurden den Reaktionsansätzen jeweils die Triphosphate der Purinbasen Adenin und Guanin sowie die Triphosphate der Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin zugesetzt. Als Kontrolle wurden die Proteine ohne Zugabe von Nukleotiden verwendet.



**Abb. 36. Untersuchung der Basenspezifität der *cry1* PHR Proteine mittels ThermoFAD.** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je drei Wiederholungen. Den Reaktionsansätzen wurde entweder ATP, CTP, GTP oder TTP in einer finalen Konzentration von 1 mM zugegeben.

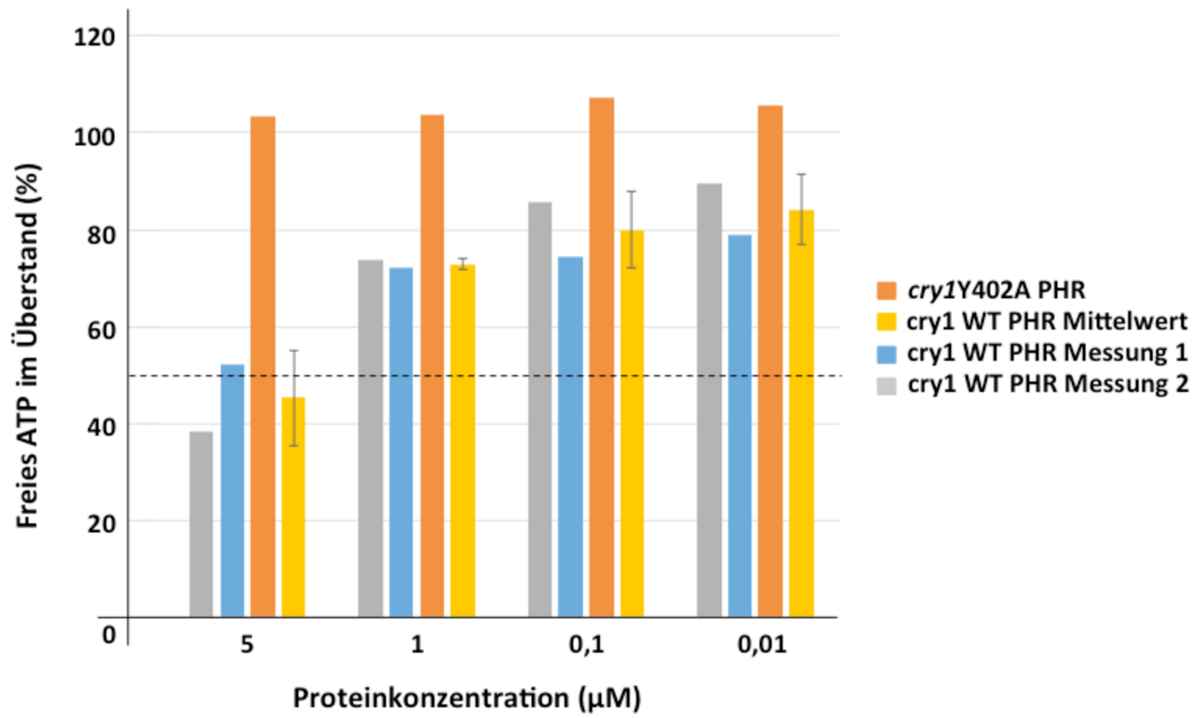
Die erhaltenen Resultate zeigen, dass die *cryIY402A* PHR Mutante, in der das für die Nukleotidbindung als essenziell vorhergesagte Tyrosin an Position 402 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, auf keines der zugegebenen Nukleotide mit einer Erhöhung der Schmelztemperatur reagiert. Es fällt aber auf, dass der Schmelzpunkt von *cryIY402A* ohne Zugabe eines Nukleotids mit 65 °C im Vergleich zu *cryIWT* PHR und *cryIL407F* PHR generell um etwa 8 °C erhöht wurde.

ATP bewirkt sowohl bei *cryIWT* PHR als auch bei *cryIL407F* PHR die stärkste Schmelzpunkterhöhung ( $\approx 17$  °C). Den geringsten Effekt auf die Schmelztemperatur haben CTP und TTP ( $\approx 2$  °C). Die Zugabe von GTP bewirkt eine mittlere Erhöhung der Schmelztemperatur ( $\approx 7$  °C).

#### 4.4 Luziferase-basierter ATP-Abreicherungs-Assay

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten die Bindung verschiedener Nukleotide an die *cryI* PHR Proteine qualitativ gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage nach der Bindungsstärke und somit nach der Dissoziationskonstanten  $K_D$ . Um eine erste Vorstellung der Dissoziationskonstanten zu gewinnen ( $\mu\text{M}$ -Bereich oder  $\text{nM}$ -Bereich) wurde ein Luziferase-basierter ATP-Abreicherungs-Assay etabliert (siehe 3.2.14). Dies diente auch dazu, um eine Grundlage für später geplante Untersuchungen mittels Isothermaler Kalorimetrie (ITC) zu haben.

Die Ergebnisse in Abb. 37 zeigen, dass in diesem Assay kein ATP aus dem Überstand der Reaktion mit *cryIY402A* abgereichert wird. Das im Überstand verbliebene ATP liefert ein Luziferasesignal über den gesamten Konzentrationsbereich (5  $\mu\text{M}$  bis 0,01  $\mu\text{M}$ ), das mit dem Signal der ATP-Referenz vergleichbar ist. Bei *cryI WT* PHR hingegen kann man erkennen, dass mit steigender Proteinkonzentration ebenfalls mehr ATP aus dem Überstand entfernt wird. Bei einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  *cryI WT* PHR befinden sich noch etwa 85% des ursprünglichen ATPs im Überstand, wohingegen bei 5  $\mu\text{M}$  Protein nur noch etwa 50 % des ATPs im Überstand verbleibt.



**Abb. 37. Ergebnisse des Luziferase-basierten ATP-Abreicherungs-Assays.** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von zwei unabhängigen Assays für *cry1*WT PHR (grau und blau) sowie den daraus resultierenden Mittelwert (gelb) mit Standardabweichung. *cry1Y402A* wurde als Negativkontrolle verwendet (orange). Freies, mit magnetischen Ni-NTA Beads inkubiertes ATP (10 nM) diente als Referenz. Dieser Wert wurde als 100 % ATP gesetzt.

## 5 Diskussion

Die Eigenschaft von Cryptochromen, ATP und andere Nukleotide zu binden, wurde bereits durch vorangegangene Studien für *Atcry1*, *Atcry2* und weitere pflanzliche und tierische Cryptochrome gezeigt (Bouly et al., 2003; Immeln et al., 2007; Özgür and Sancar, 2006; Engelhard et al., 2014b). Darüber hinaus wurde auch bereits nachgewiesen, dass die PHR-Domäne von *cry1* in *in-vitro* Experimenten eine verstärkte Photoreduktion von  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  bei Zugabe von ATP aufweist (Engelhard et al., 2014a; Müller et al., 2015; Cailliez et al., 2014).

In einem *suppressor screen* einer spätblühenden *A. thaliana* Linie wurde das *cry1L407F* Mutanten Allel identifiziert. Die *cry1L407F* Mutantenlinie blüht früh unter Kurztagbedingungen und zeigt eine Hypersensitivität gegenüber blauem, rotem und dunkelrotem Licht. Des Weiteren weist diese Mutante im Dunkel einen *cop*-Phänotyp auf. Ein Beispiel hierfür ist die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums von Keimlingen, welche normalerweise erst als Reaktion auf Belichtung auftritt. Es wurde auch gezeigt, dass diese Hypersensitivität nicht auf ein erhöhtes *cry1*-Proteinlevel im Vergleich zu Wildtyplinie zurückzuführen ist. Entsprechend wurde die Hypothese aufgestellt, dass das *cry1L407F* Protein entweder einen ATP-gebundenen Zustand simuliert oder eine höhere Affinität zu ATP ausweist (Exner et al., 2010).

Diese Erkenntnisse bildeten die Grundlage für die vorliegende Arbeit, von der es ein Ziel war, eine Erklärung für die erhöhte biologische Aktivität der *cry1L407F* Mutante zu finden. In diesem Kontext sollte auch die generelle Rolle der ATP-Bindung von Cryptochromen untersucht werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit von der Expression und Aufreinigung bis hin zu Proteinstabilitätsstudien diskutiert.

### 5.1 Expression und Aufreinigung

Die Expression von löslichen Cryptochromen von voller Länge in *E. coli* ist bisher noch nicht erfolgreich durchgeführt worden. Der Großteil der Proteine liegt unlöslich in *inclusion bodies* vor. Die Photochemie und die ATP-Bindung der Cryptochrome wird ausschließlich durch die PHR-Domäne vermittelt und die PHR-Domäne der Cryptochrome verfügt über biologische

Aktivität und eine mit Cryptochrom-Volllängenproteinen vergleichbare Photochemie. Aus diesem Grund wurde die Arbeit an den heterolog in *E. coli* exprimierten PHR-Domänen durchgeführt (siehe Abb. 20).

Die Konzentration der löslichen PHR-Domänen ist im Vergleich zu anderen heterolog exprimierten Proteine mit ca. 0,2 mg pro Liter Kultur sehr gering (siehe Abb. 26). Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel ist die Bande des rekombinanten Proteins neben vielen anderen prominenten Banden im Zell-Lysat (Lys) vor der Aufreinigung schwer zu identifizieren. Im Western Blot wird aber die Bande auf der entsprechenden Höhe deutlich detektiert. Vergleicht man die Signale im Zell-Lysat (Lys) mit den Signalen des Säulendurchflusses (FT), so wird deutlich, dass der Großteil des im Lysat befindlichen rekombinanten Proteins erfolgreich und weitgehend quantitativ von der Ni-NTA Säule gebunden wird. Lediglich ein geringer Anteil des Proteins findet sich im Durchfluss. Nach dem Zusammenführen und Ankonzentrieren der Peakfraktionen sieht man im SDS-Gel, dass das rekombinante Protein erfolgreich aufgereinigt wurde. Jedoch findet sich auch eine deutliche Bande im höhermolekularen Bereich. Da im immunologischen Nachweis jedoch keine hochmolekularen Banden detektiert werden, handelt es sich bei der zusätzlichen Bande sehr wahrscheinlich um ein *E. coli* Wirtsprotein, welches durch den Aufreinigungsmethode unspezifisch angereichert wird. Ziel des Aufreinigungsprozesses war es, neben einer zufriedenstellenden Ausbeute der heterologen Proteine auch sicherzustellen, dass das finale Produkt möglichst frei von durch den Aufreinigungsprozess bedingten Reduktionsmitteln und Nukleinsäuren ist. Aus diesem Grund wurde im Anschluss eine präparative Gelfiltration durchgeführt. Hierbei sollte der Puffer ausgetauscht und somit das für die Aufreinigung erforderliche Reduktionsmittel weitestgehend abgereichert werden und mögliche gebundenen Nukleinsäuren vom Protein entfernt werden, um ein größtenteils homogenes Konzentrat des Zielproteins zu erhalten. Somit wurde sichergestellt, dass Verunreinigungen durch andere Proteine und Nukleinsäuren und Pufferbestandteile nicht zukünftig geplante *in-vitro* Experimente beeinflussen und die Ausgangsbedingungen für die Analyse unterschiedlicher Proteinvarianten vergleichbar sind.

Bei der präparativen Gelfiltration zeigte sich interessanter Weise, dass vor dem Hauptpeak ein höhermolekularer Vorpeak eluiert, bei dem das Absorptionsverhältnis von 260/280 nm im Vergleich zum Hauptpeak umgekehrt ist (siehe Abb. 25). Der Pre-Peak zeigte eine deutlich höhere Absorption bei 260 nm als bei 280 nm. Dies spricht für einen hochmolekularen Komplex, der aus Nukleinsäuren und Proteinen besteht. In Gelanalysen konnte nachgewiesen werden, dass dieser Komplex das rekombinante Protein enthält (Daten nicht gezeigt). Durch

die präparative Gelfiltration konnte folglich die Reinheit des Zielproteins nochmals entscheidend verbessert werden (siehe Abb. 26).

## 5.2 Nachweis der FAD-Bindung

Nachdem die rekombinanten Proteine aufgereinigt vorlagen, musste deren FAD-Bindung und Photoreduzierbarkeit als Voraussetzung für photobiologisch aktives Protein getestet werden. Hierzu wurde photometrisch ein Absorptionsspektrum im Bereich von 220 nm bis 700 nm aufgenommen.

Die Absorptionsspektren zeigten einen Peak bei 280 nm, der hauptsächlich auf die Absorption der aromatischen Aminosäuren im Proteingerüst des Apoproteins zurückzuführen ist. Die Absorption im sichtbaren Lichtspektrum zeigt ein dreigipfliges Absorptionsmaximum im Bereich von 450 nm. Dieses dreigipflige Spektrum ist typisch für an Protein gebundenes, oxidiertes FAD (siehe Abb. 27). Somit waren also die Grundvoraussetzungen für *in-vitro* Belichtungsexperimente und weitere Studien gegeben.

## 5.3 Vergleich der Photoreduktionskinetiken von *cry1WT* PHR und *cry1L407F* PHR

Durch Simulationen der Moleküldynamik wurde von *Exner et al.* vorgeschlagen, dass die ATP-Bindung eine stabilisierende Wirkung auf die PHR Domäne von *cry1* hat (Exner et al., 2010). Dies konnte auch in *in-vitro* Versuchen durch partielle Proteolyse bestätigt werden (Burney et al., 2009a). Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Photoreduktion von *cry1* PHR ebenfalls durch die Bindung von ATP und weiterer Nukleotiden beeinflusst ist und ob eine Veränderung der Photoreduktionskinetik von *cry1L407F* PHR im Vergleich zum Wildtypprotein eine mögliche Erklärung für die Hyperaktivität des *cry1L407F* Proteins liefern kann. Es wäre durchaus denkbar, dass entweder durch eine verstärkte Photoreduktion in der *cry1L407F* Mutante mehr signalaktives FADH<sup>o</sup> gebildet wird, oder durch eine verlangsamte Dunkelreversion der Pool an signalaktivem Photorezeptor länger bestehen bleibt.



Hierzu wurden die cry1 PHR Varianten wie unter 3.2.12.1 beschrieben belichtet. In Belichtungsexperimenten ohne Zugabe der Nukleotide wurde zuvor für jede Proteinpräparation sichergestellt, dass die Proteine unter den gewählten Bedingungen photoreduzierbar waren und auch über den gesamten Verlauf der Belichtung intakt blieben. Als Nachweis für die funktionelle Integrität der Proteine während des Belichtungs Vorgangs wurde auf folgende Aspekte besonders geachtet: Zum einen die Erhaltung der dreigipfligen Feinstruktur. Würde das Holoprotein im Verlauf der Belichtung den Kofaktor FAD verlieren und somit eine wichtige strukturgebende Komponente, würde diese Feinstruktur verloren gehen. Zum anderen ein Driften der Basislinie. Fällt durch die Belichtung beschädigtes Protein bei der Aufnahme der Absorptionsspektren aus, kommt es zu einer verstärkten Lichtbrechung (*light scattering*) durch Partikel, die durch präzipitiertes Protein gebildet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass bei den unter 3.2.12.1 beschriebenen Belichtungsbedingungen in Gegenwart eines Reduktionsmittels der FAD-Kofaktor der Proteine vom oxidierten Zustand in den semireduzierten Zustand überführt werden konnte. Dies zeigt sich im Spektrum durch die Abnahme der Absorption bei 450 nm bei gleichzeitiger Zunahme der Absorption bei 560 nm. Um zu zeigen, dass nach der erfolgreichen Reduktion des Kofaktors dieser wieder in den Ausgangszustand zurückkehrt und weiterhin mit dem Protein assoziiert bleibt, wurde nach der Photoreduktion noch die Dunkelreversion des Kofaktors analysiert (siehe Abb. 29). Hierbei zeigte sich, dass die Kofaktoren der Proteine im Dunkel über einen gewissen Zeitraum wieder zum Ausgangszustand (FAD<sub>ox</sub>) zurückkehrten. Das Beibehalten des dreigipfligen FAD<sub>ox</sub> Spektrums war hierbei ein Beweis dafür, dass die Kofaktoren auch nach der Belichtung noch mit dem Protein assoziiert waren und das Holoprotein somit als vollständig funktional einzustufen ist.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Proteine für umfassende Belichtungsexperimente genutzt werden können, wurden folgende Belichtungen mit der cry1WT PHR und der cry1L407F PHR durchgeführt: Protein ohne Nukleotid und Protein mit Zugabe der Nukleotide ATP, ADP, AMP-PNP, NADP und NADPH (final je 1 mM). Im Anschluss an die Belichtung wurde jeweils noch eine Kinetik der Dunkelreversion aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 32 und Abb. 33 zusammengestellt. Die ermittelten Zahlenwerte hierzu können Tab. 1 und Tab. 2 entnommen werden. Es zeigt sich im Vergleich der Kinetiken von cry1WT PHR und cry1L407F PHR, dass ATP und ADP die Photoreduktion in beiden Proteinen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne ATP beschleunigen. Dies ist konsistent mit früheren Studien, in denen eine verstärkte Photoreduktion von cry1 in

Gegenwart von ATP, ADP und AMP-PNP beobachtet wurde (Brautigam et al., 2004). Der verstärkende Effekt von AMP-PNP auf die Photoreduktion von cry1 konnte in den hier erhobenen Daten nur in den ersten Minuten der Belichtung beobachtet werden. Nach den Daten von Brautigam et al. (2004) hat AMP-PNP (Brautigam et al., 2004) eine um das Dreifache geringere Affinität zu cry1 als ATP, dessen Affinität in einer vergleichbaren Studie ermittelt wurde (Bouly et al., 2003). Diese Geringere Affinität von AMP-PNP könnte eine mögliche Erklärung dafür liefern, warum AMP-PNP in den in dieser Arbeit gezeigten Daten die Photoreduktion von cry1 nur in den ersten Minuten der Belichtung verstärkt.

Im absoluten Vergleich verläuft aber die Photoreduktion in der *cry1L407F* Mutante sowohl mit als auch ohne Zugabe von ATP langsamer als im Wildtypprotein. Zusätzlich lässt sich in den Spektren in Abb. 28 erkennen, dass im *steady-state* nach 180 min Blaubelichtung in der *cry1L407F* Mutante weniger FADH<sup>o</sup> gebildet wurde als im Wildtyp. Abgeleitet aus diesen Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass die Hypersensitivität der *cry1L407F* sowohl bei Zugabe von ATP als auch in Abwesenheit von ATP nicht auf eine beschleunigte Photoreduktion zurückzuführen ist. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die *cry1L407F* Mutante weniger FADH<sup>o</sup> im *steady-state* akkumuliert, wäre eine beschleunigte Dunkelreversion, d.h. das Photogleichgewicht würde, verglichen mit dem Wildtyp, mehr auf Seite des FAD<sub>ox</sub> liegen. Vergleicht man aber die Daten der Dunkelreversionen beider Proteine mit und ohne ATP, zeigt sich, dass die *cry1L407F* Mutante im Vergleich zum Wildtyp in beiden Fällen eine verlangsamte Dunkelreversion aufweist. Demnach kann die geringere Akkumulation von FADH<sup>o</sup> nicht durch eine beschleunigte Dunkelreversion erklärt werden. Die verlangsamte Dunkelreversion bedeutet physiologisch, dass in der *cry1L407F* PHR nach Beendigung der Belichtung der signalaktive Zustand FADH<sup>o</sup> länger bestehen bleibt als im Wildtyp. Somit würde auch eine kurzzeitige Bestrahlung von *cry1L407F* PHR eine längere Lebensdauer des signalaktiven Zustands bewirken. Dies erklärt aber beispielsweise nicht den *cop*-Phänotyp (De-etiolierung des Hypokotyls, Öffnung der Kotyledonen) von *cry1L407F* Keimlingen im Dunkel, da die Samenkeimung dieser Keimlinge lediglich durch Rotlicht induziert wurde. Durch Rotlicht kann aufgrund der Photochemie des FAD kein FADH<sup>o</sup> gebildet werden.

Nach den hier vorliegenden Daten kann somit nicht geschlossen werden, dass Blaulicht eine verstärkte Bildung des signalaktiven FADH<sup>o</sup> in *cry1L407F* und somit dessen Hyperaktivität bewirkt.

## 5.4 Einfluss verschiedener Nukleotide auf die Proteinstabilität

Der Einfluss verschiedener Nukleotide auf die Proteinstabilität von cry1WT PHR und *cry1L407F*PHR wurde in dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht: Zum einen wurde die Stabilität der Proteine nach Zugabe verschiedener Nukleotide in einer partiellen Trypsinierung untersucht. Zum anderen lieferte der ThermoFAD-Assay Daten über die thermische Stabilität der Proteine in Gegenwart verschiedener Nukleotide.

In einem weiteren Ansatz des ThermoFAD-Assays wurde zudem noch die Substratspezifität der Bindung hinsichtlich der im Substrat vorhandenen Basen der Nukleotide untersucht.

### 5.4.1 Partielle Trypsinierung der PHR Domäne von Cryptochrom 1

Für cry1WT PHR verringert die Zugabe aller Nukleotide (ATP, ADP, AMP-PNP, NADP, NADPH, NAD, und NADH) die Sensitivität gegenüber Trypsin (siehe Abb. 34). Dabei erweisen sich ATP, ADP und AMP-PNP als besonders wirksam, da sie die Proteolyse nahezu komplett verhindern. Dies gilt sowohl für vorbelichtete als auch für dunkeladaptierte Proben. Auch bei der *cry1L407F* PHR zeigen diese drei Nukleotide den stärksten Effekt hinsichtlich der Stabilisierung des Proteins gegenüber Trypsin. Im absoluten Vergleich der beiden Proteine ist jedoch auffällig, dass die Stabilisierung durch Nukleotide bei der *cry1L407F* Mutante generell fast 30% geringer ausfällt als beim WT Protein. Interessanterweise lassen sich im Falle von *cry1L407F* PHR jedoch Unterschiede zwischen vorbelichteten und dunkeladaptierten Proben feststellen. Die vorbelichteten Proben erwiesen sich etwa um etwa 10% stabiler als die vergleichbaren Dunkelproben. Dieses Ergebnis ist jedoch eher als Trend zu interpretieren, da der Unterschied von 10% in einer gelbasierten Quantifizierung unter den angewandten Bedingungen nicht als signifikant betrachtet werden sollte. Hier wären weitere Untersuchungen und Wiederholungen notwendig, um eine mögliche Signifikanz herauszuarbeiten. Auch könnte eine genauere Methode zur Quantifizierung hilfreich sein. Eine Möglichkeit wäre *Liquid Chromatography-Mass Spektrometry* (LC-MS). Hier könnte neben einer exakteren Quantifizierung gleichzeitig auch noch ein *peptide mapping* Aufschluss über die erhaltenen Fragmente und die für Trypsin unzugänglichen und zugänglichen Schnittstellen geben.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich aber folgendes schlussfolgern: Die *cry1L407F* Mutante hat sehr wahrscheinlich eine andere Konformation, als das Wildtypprotein, da sie

sowohl mit als auch ohne Nukleotide eine geringere Widerstandsfähigkeit gegenüber Trypsin besitzt. Diese Konformationsänderung kann durch die Bindung von Nukleotiden hinsichtlich der Stabilität gegenüber Trypsin nur teilweise kompensiert werden. Diese Interpretation der Daten könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Hypersensitivität der *cry1L407F* Mutante durch eine generelle strukturelle Veränderung hervorgerufen wird, die aber nicht notwendigerweise den ATP-gebundenen Zustand widerspiegelt, da ATP zusätzlich noch einen stabilisierenden Effekt in der partiellen Trypsinierung von *cry1L407F* PHR hat. Somit konnte die von Exner et al. postulierte Konformationsänderung zwar experimentell bestätigt werden, aber es ist nicht eindeutig zu belegen, dass diese Konformationsänderung den ATP-gebundenen Zustand von *cry1L407F* abbildet (Exner et al., 2010).

#### 5.4.2 Einfluss von Nukleotiden auf die thermische Stabilität von Cryptochrom 1

Die thermische Stabilität der *cry1* PHR Proteine wurde mittels des ThermoFAD-Assays untersucht. Hierbei wurde die Schmelztemperatur der Proteine mit und ohne Nukleotide gemessen.

Für *cry1WT* PHR lässt sich auch hier feststellen, dass die Nukleotide ATP, ADP und AMP-PNP im Vergleich mit der Proteinprobe ohne Nukleotide die thermische Stabilität des Proteins stark erhöhen. Auch hier kann, wie schon bei der partiellen Trypsinierung, kein signifikanter Unterschied zwischen vorbelichteten Proben und dunkeladaptierten Proben beobachtet werden. NAD und NADH bewirken eine mittlere Erhöhung der Schmelztemperatur, NADP und NADPH eine sehr geringe, aber signifikante Erhöhung der Schmelztemperatur. Auch bei diesen Nukleotiden gibt es keinen Unterschied zwischen Dunkelproben und vorbelichteten Proben.

Auch bei *cry1L407F* PHR bewirkt die Zugabe von ATP, ADP und AMP-PNP die stärkste Zunahme der Schmelztemperatur. Ähnlich wie bei der partiellen Trypsinierung, haben die Nukleotide NAD, NADH und NADP nur eine geringe Auswirkung auf die Erhöhung des Schmelzpunktes und damit auf die Proteinstabilität. Lediglich NADH bewirkt eine mittlere Erhöhung der Schmelztemperatur. Interessant ist, dass es bei der thermischen Stabilität von *cry1L407F* PHR keinen Unterschied zwischen belichteten und unbelichteten Proben gibt, bei der Stabilität in Gegenwart von Trypsin jedoch zumindest für NADPH und NADH ein solcher Unterschied zwischen Licht- und Dunkelproben ansatzweise zu (siehe Abb. 34 und Abb. 35). Dies könnte auf eine lichtinduzierte Konformationsänderung im Protein hinweisen,

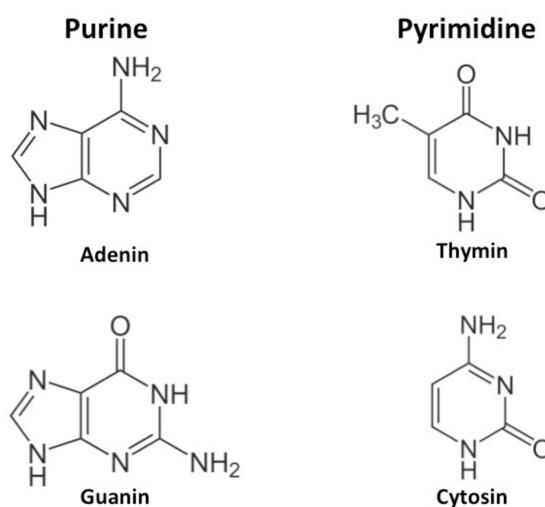
die den Zugang zu weiteren Trypsinschnittstellen ermöglicht, ohne die thermische Stabilität zu beeinträchtigen.

#### 5.4.3 Basenspezifität der Nukleotidbindung von Cryptochrom 1

Für cry1WT PHR wurde die Bindung des ATP-Analogons AMP-PNP in der Kristallstruktur gezeigt (Brautigam et al., 2004). Dabei ist der Adeninring des AMP-PNP zwischen Tyrosin 402 und Leucin 296 eingepasst. Adenin hat ein Puringrundgerüst mit einer Aminogruppe an Position 2. Es wäre durchaus denkbar, dass ebenso andere Verbindungen wie beispielsweise Guanin mit einem ähnlichen Grundgerüst gebunden werden können. Guanin ist ebenfalls ein Purin, welche neben einer Aminogruppe an Position 2 noch ein Sauerstoffatom an Position 6 besitzt (siehe Abb. 38).

Die unter 4.3.2.2 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass von den getesteten Triphosphaten lediglich die Purinbase Adenin eine starke Erhöhung ( $>10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) der Schmelztemperatur von cry1WT PHR und cry1L407F PHR im ThermoFAD-Assay bewirkt.

GTP zeigt zumindest eine mittlere Stabilisierung der Proteine gegenüber einer Temperaturerhöhung um ca.  $5^{\circ}$  Grad. Dies deutet darauf hin, dass GTP grundsätzlich von Cryptochrom 1 gebunden werden kann, jedoch nicht sehr effektiv. Die Bindung von Guanin ist sehr wahrscheinlich auf die heterozyklische Purinstruktur zurückzuführen, welche bis auf die oben genannten Substituenten identisch mit der Grundstruktur von Adenin ist.



**Abb. 38. Chemische Strukturen der Nukleinsäurebasen.** Die Abbildung zeigt die chemischen Strukturen der Purinbasen Adenin und Guanin sowie der Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin.

Die verringerte Bindung von Guanin ist möglicherweise auf den Sauerstoff an Position 6 zurückzuführen, welcher aufgrund seiner Ladung die Gesamtladung des Moleküls verändert. Auch die N2 Aminogruppe erschwert aufgrund einer sterischen Hinderung mit Leu-398 ein Einpassen von GTP in die Bindetasche. Ob die Bindung von Guanin oder GTP *in-vivo* ebenfalls möglich ist, ist ungeklärt und kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Es könnte sich hierbei auch um ein *in-vitro* Artefakt handeln.

Die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin zeigen eine kaum signifikante Erhöhung der Schmelztemperatur von cry1WT PHR und cry1L407F PHR. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dies zum einen dadurch begründet ist, dass es sich um monozyklische Moleküle handelt und Thymin und Cytosin aufgrund dieses strukturellen Unterschiedes nicht in der Bindetasche von Cryptochrom gehalten werden. Hinzu kommt, dass beide Basen mindestens ein Sauerstoffmolekül tragen, welches möglicherweise, ähnlich wie bei Guanin, aufgrund der Ladung ein Hineingleiten in die Bindetasche durch elektrostatische Abstossung erschwert oder gar verhindert.

Die cryY402A Mutante, bei der das für die Nukleotidbindung essentielle Tyrosin an Position 402 gegen Alanin ausgetauscht wurde, reagiert in diesem Experiment wie erwartet auf keines der zugesetzten Nukleotide (siehe hierzu auch 1.4.4.3., Seite 36).

Die Daten belegen, dass der Adeninring eine für die Nukleotidbindung von cry1 essentielle Strukturkomponente für die Bindung des Substrates ist. Dies wurde auch in der Kristallstruktur von cry1 gezeigt (Brautigam et al., 2004). Andere Komponenten, die Einfluss auf die Bindung nehmen können, sind die Phosphatgruppen. Die Ergebnisse der Schmelzpunktanalyse legen nahe, dass das endständige  $\gamma$ -Phosphat des ATP einen Einfluss auf die Stabilisierung von cry1 hat (siehe Abb. 35), da die Schmelztemperatur signifikant gegenüber ADP erhöht ist. Der einzige strukturelle Unterschied zwischen beiden Nukleotiden ist die bei ADP fehlende  $\gamma$ -Phosphatgruppe. Obwohl AMP-PNP ebenfalls ein  $\gamma$ -Phosphat besitzt, ist der stabilisierende Einfluss auf cry1 eher mit dem Effekt von ADP als ATP vergleichbar. Hier könnte natürlich die nicht-hydrolysierbare Bindung zwischen  $\gamma$ - und  $\beta$ -Phosphat des AMP-PNP eine Rolle spielen, da durch das Einbringen eines Stickstoffatoms die Ladungseigenschaften des Moleküls verändert werden. Auch die Daten des Trypsin-Assays sind diesbezüglich nicht eindeutig. Ob das  $\gamma$ -Phosphat die  $K_D$  beeinflusst und somit ATP stärker an cry1 bindet oder ob das  $\gamma$ -Phosphat auf eine andere Weise Einfluss auf die Stabilität von cry1 nimmt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Hierzu müssten weitere ThermoFAD-Assays mit den Nukleotiden AMP, ADP und ATP durchgeführt

werden. Möglicherweise könnte dann auch eine Aussage über den Einfluss der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphatgruppen auf die Nukleotidbindung getroffen werden.

## 5.5 Stärke der ATP-Bindung von Cryptochrom 1

Um in einer ersten Näherung die ATP-Dissoziationskonstante von Cryptochrom 1 zu bestimmen, wurde der unter 3.2.14 beschriebene Luziferase-basierte ATP-Assay eingesetzt. Die Daten des Assays zeigen, dass die Dissoziationskonstante  $K_D$  von ATP für cry1 im Bereich von 5  $\mu$ M liegen sollte. Dieser Wert diene lediglich als erster Orientierungspunkt, um die Bedingungen für weiterführende Experimente wie Isotherme Titrationskolorimetrie (ITC) einzugrenzen. In einer mit dieser Arbeit assoziierten Masterarbeit wurden diese ITC-Experimente anschließend durchgeführt (Niemann, 2016). Die erhaltenen Daten lieferten eine  $K_D$  von  $3,3 \pm 1,6 \mu$ M für die ATP-Bindung von Cryptochrom 1 (Orth et al., 2017). Dies zeigt, dass der Luziferase-basierte ATP-Assay für die erste Abschätzung der Dissoziationskonstanten geeignet war. Die Vorteile dieses Assays gegenüber ITC-Messungen liegen darin, dass im Vergleich zu ITC wenig Protein und wenig Ligand eingesetzt werden muss. Da die heterologe Expression der Cryptochrom PHRs in *E. coli* eine geringe Ausbeute an löslichem Protein lieferte (ca. 0,2 mg pro Liter *E. coli* Kultur), war es von Vorteil, die Bedingungen für die materialaufwendigeren ITC-Messungen im Vorfeld mit einer weniger aufwendigen Methode zu testen.

Durch die dann erhaltenen ITC-Daten lässt sich die von Exner et al., (2010) aufgestellte Hypothese, dass die cry1L407F Mutante eine höhere Affinität gegenüber ATP hat, als cry1WT, nicht aufrecht erhalten, da die ITC-Messungen eine schwächere  $K_D$  für cry1L407F ausgaben als für den WT.

## 5.6 Abschließende Bemerkungen

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Nukleotide in *in-vitro* Experimenten zum einen einen verstärkenden Effekt auf die Photochemie von cry1 haben und

zum anderen das Holoprotein durch ihre Bindung stabilisieren. Nun stellt sich die Frage, welche biologische Funktion die oben genannten Effekte *in-vivo* haben?

Für cry1 und ATP wurde eine  $K_D$  von 3,3  $\mu\text{M}$  ermittelt. Der ATP-Gehalt in einer Pflanzenzelle liegt im millimolaren Bereich (Blatt, 1987). Dies bedeutet, dass nahezu alle cry1 Moleküle mit ATP assoziiert vorliegen. Unter solchen Bedingungen ist es schwer vorstellbar, dass ATP durch seine An- oder Abwesenheit eine direkte regulatorische Wirkung auf die Photochemie von cry1 hat.

Eine weitere denkbare biologische Funktion könnte die eines Sensors für den Energiehaushalt der Zelle sein. So könnte beispielsweise durch das Verhältnis von cry1/ATP-Komplexen zu cry1/ADP-Komplexen und ein daraus resultierendes nachgeschaltetes Signal das ATP/ADP Verhältnis gemessen werden. Doch auch diese mögliche biologische Funktion der ATP Bindung von cry1 erscheint eher unwahrscheinlich, da sowohl ATP als auch ADP an cry1 binden und deren Effekte hinsichtlich der Photochemie sehr ähnlich sind. Diese Vergleichbarkeit der Effekte von ATP und ADP erschwert ein differenzierbares Signaling.

Somit konnten in dieser Arbeit zwar wesentliche Aspekte der Nukleotidbindung von cry1 aufgeklärt werden, die Frage nach der biologischen Funktion der ATP Bindung von cry1 bleibt aber weiterhin offen.



## 6 Zusammenfassung

Während der Durchführung dieser Arbeit wurden verschiedene *in-vitro* Techniken und Assays benutzt, um die Nukleotidbindung von Cryptochrom 1 aus *Arbidopsis thaliana* näher zu charakterisieren. Die Fähigkeit von pflanzlichen Cryptochromen, ATP zu binden wurde bereits in 2003 beschrieben (Bouly et al., 2003) und auch die Bindestelle für ATP konnte in einer Kokristallstruktur von Cryptochrom 1 und AMP-PNP identifiziert werden (Brautigam et al., 2004). Jedoch wurde die ATP-Bindung von Cryptochrom 1 hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Stabilität der PHR-Domäne nicht weiter untersucht, ebenso nicht die Spezifität der Nukleotide.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PHR-Domäne durch die Bindung von ATP und ADP eine kompaktere Struktur einnimmt, welche sowohl den Prozess der Photoreduktion des FAD beschleunigt, als auch das Protein in seiner Gesamtheit stabilisiert. Der stabilisierende Effekt konnte sowohl auf thermischer Ebene über eine Erhöhung der Schmelztemperatur als auch auf molekularer Ebene durch eine erhöhte Resistenz gegenüber der Protease Trypsin nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde über Schmelzpunktbestimmung und Photoreduktionsexperimente der Einfluss weiterer Nukleotide wie NAD(H) und NADP(H) auf diese Prozesse getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Nukleotide keine signifikanten Effekte auf die Photoreduktion und die Proteinstabilität von cry 1 haben. Daher ist auch eine Bindung dieser Nukleotide eher unwahrscheinlich.

Es konnte in dieser Arbeit ferner gezeigt werden, dass die Bindung von Nukleotiden spezifisch für ATP oder dessen Derivate ist. Die Tatsache, dass selbst das strukturell sehr ähnliche GTP in Stabilitätsassays keinen Effekt auf die PHR Domäne von Cryptochrom 1 hat, spricht für die Selektivität der Bindung von Adenin-Derivaten. Der Adeninring ist die für die Bindung essentielle strukturelle Komponente. Trotzdem legen die Daten nahe, dass auch das endständige  $\gamma$ -Phosphat des ATP einen Einfluss auf die Stabilität von cry1 hat.

Die Verwendung der *cry1Y402A* PHR Mutante in den Assays zeigte, dass das Tyrosin an Position 402 essentiell für die ATP-Bindung von Cryptochrom 1 ist, da diese Mutante in keinem der Assays auf die Zugabe von ATP (oder anderen Nukleotiden) reagierte.

Für die *cry/L407F* PHR Mutante konnte gezeigt werden, dass die Hypersensitivität unabhängig von der ATP-Bindung nicht durch eine verstärkte Photoreduktion zurückzuführen ist. Auch das Mimikrieren eines ATP-gebundenen Zustandes konnte anhand der vorliegenden Daten ausgeschlossen werden. Vielmehr ist eine strukturelle Veränderung in der Nähe der ATP-Bindestelle für die Hyperaktivität verantwortlich, wobei der genaue Mechanismus der der Hyperaktivität zu Grunde liegt, nicht abschließend geklärt werden konnte.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmad, M. and Cashmore, A.R.** (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., and Cashmore, A.R.** (1998a). Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell*.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Smirnova, O., and Cashmore, A.R.** (1998b). The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome a in vitro. *Mol. Cell*.
- Ahmad, M., Lin, C., and Cashmore, A.R.** (1995). Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J.*
- Aihara, Y., Yamamoto, T., Okajima, K., Yamamoto, K., Suzuki, T., Tokutomi, S., Tanaka, K., and Nagatani, A.** (2012). Mutations in N-terminal flanking region of blue light-sensing light-oxygen and voltage 2 (LOV2) domain disrupt its repressive activity on kinase domain in the *Chlamydomonas* phototropin. *J. Biol. Chem.* **287**: 9901–9.
- Ando, E., Ohnishi, M., Wang, Y., Matsushita, T., Watanabe, A., Hayashi, Y., Fujii, M., Ma, J.F., Inoue, S.I., and Kinoshita, T.** (2013). TWIN SISTER OF FT, GIGANTEA, and CONSTANS have a positive but indirect effect on blue light-induced Stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*
- Andrés, F. and Coupland, G.** (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* **13**: 627–639.
- Aubert, C., Vos, M.H., Mathis, P., Eker, A.P.M., and Brettel, K.** (2000). Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* **405**: 586–570.
- Banerjee, R., Schleicher, E., Meier, S., Viana, R.M., Pokorny, R., Ahmad, M., Bittl, R., and Batschauer, A.** (2007). The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *J. Biol. Chem.* **282**: 14916–14922.
- Batschauer, A.** (1993). A plant gene for photolyase: An enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage. *Plant J.*
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979). *Nucleic Acids Research*. *Nucleic Acids Res.* **36**: ii–ii.
- Blatt, M.R.** (1987). Electrical characteristics of stomatal guard cells: The contribution of

- ATP-dependent, “Electrogenic” transport revealed by current-voltage and difference-current-voltage analysis. *J. Membr. Biol.*
- Bouly, J.-P.P., Schleicher, E., Dionisio-Sese, M., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., Bakrim, N., Meier, S., Batschauer, A., Galland, P., Bittl, R., and Ahmad, M.** (2007a). Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J. Biol. Chem.* **282**: 9383–9391.
- Bouly, J.P., Giovani, B., Djamei, A., Mueller, M., Zeugner, A., Dudkin, E.A., Batschauer, A., and Ahmad, M.** (2003). Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with Arabidopsis and human cryptochrome-1. *Eur. J. Biochem.* **270**: 2921–2928.
- Bouly, J.P., Schleicher, E., Dionisio-Sese, M., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., Bakrim, N., Meier, S., Batschauer, A., Galland, P., Bittl, R., and Ahmad, M.** (2007b). Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J. Biol. Chem.* **282**: 9383–9391.
- Brandt, S., von Stetten, D., Günther, M., Hildebrandt, P., and Frankenberg-Dinkel, N.** (2008). The Fungal Phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **283**: 34605–34614.
- Brautigam, C.A., Smith, B.S., Ma, Z., Palnitkar, M., Tomchick, D.R., Machius, M., and Deisenhofer, J.** (2004). Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 12142–12147.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K.I., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V.A., Todo, T., Tainer, J.A., and Getzoff, E.D.** (2003). Identification of a new cryptochrome class: Structure, function, and evolution. *Mol. Cell.*
- Bu, Q., Castillon, A., Chen, F., Zhu, L., and Huq, E.** (2011). Dimerization and blue light regulation of PIF1 interacting bHLH proteins in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.*
- Burgie, E.S. and Vierstra, R.D.** (2014). Phytochromes: An atomic perspective on photoactivation and signaling. *Plant Cell.*
- Burney, S., Hoang, N., Caruso, M., Dudkin, E.A., Ahmad, M., and Bouly, J.-P.P.** (2009a). Conformational change induced by ATP binding correlates with enhanced biological function of Arabidopsis cryptochrome. *FEBS Lett.* **583**: 1427–1433.
- Burney, S., Hoang, N., Caruso, M., Dudkin, E.A., Ahmad, M., and Bouly, J.P.** (2009b). Conformational change induced by ATP binding correlates with enhanced biological function of Arabidopsis cryptochrome. *FEBS Lett.* **583**: 1427–1433.
- Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, H.W., and Hendricks, S.B.** (1959). DETECTION,

- ASSAY, AND PRELIMINARY PURIFICATION OF THE PIGMENT CONTROLLING PHOTORESPONSIVE DEVELOPMENT OF PLANTS. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Cailliez, F., Müller, P., Gallois, M., and De La Lande, A.** (2014). ATP binding and aspartate protonation enhance photoinduced electron transfer in plant cryptochrome. *J. Am. Chem. Soc.* **136**: 12974–12986.
- Casal, J.J. and Boccalandro, H.** (1995). Co-action between phytochrome B and HY4 in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*.
- Cashmore, A.R.** (1999). Cryptochromes: Blue Light Receptors for Plants and Animals. *Science* (80-. ). **284**: 760–765.
- Castillon, A., Shen, H., and Huq, E.** (2009). Blue light induces degradation of the negative regulator phytochrome interacting factor 1 to promote photomorphogenic development of arabidopsis seedlings. *Genetics*.
- Castrillo, M., García-Martínez, J., and Avalos, J.** (2013). Light-dependent functions of the *Fusarium fujikuroi* CryD DASH cryptochrome in development and secondary metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Celaya, R.B. and Liscum, E.** (2004). Phototropins and associated signaling: providing the power of movement in higher plants. *Photochem. Photobiol.* **81**: 73–80.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.-O., van der Horst, G.T.J., Batschauer, A., and Ahmad, M.** (2011). The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 335–64.
- Christie, J.M., Blackwood, L., Petersen, J., and Sullivan, S.** (2015). Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant Cell Physiol.* **56**: 401–413.
- Christie, J.M., Corchnoy, S.B., Swartz, T.E., Hokenson, M., Han, I.-S., Briggs, W.R., and Bogomolni, R.A.** (2007). Steric interactions stabilize the signaling state of the LOV2 domain of phototropin 1. *Biochemistry* **46**: 9310–9.
- Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E., and Briggs, W.R.** (1998). *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**: 1698–701.
- Clack, T., Mathews, S., and Sharrock, R.A.** (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.*
- Conrad, K.S., Manahan, C.C., and Crane, B.R.** (2014). Photochemistry of flavoprotein light sensors. *Nat. Chem. Biol.* **10**: 801–809.

- Crosson, S. and Moffat, K.** (2002). Photoexcited Structure of a Plant Photoreceptor Domain Reveals a Light-Driven Molecular Switch. *Plant Cell* **14**: 1067–1075.
- Crosson, S., Rajagopal, S., and Moffat, K.** (2003). The LOV Domain Family: Photoresponsive Signaling Modules Coupled to Diverse Output Domains <sup>†</sup>. *Biochemistry* **42**: 2–10.
- Daiyasu, H., Ishikawa, T., Kuma, K.I., Iwai, S., Todo, T., and Toh, H.** (2004). Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes to Cells*.
- Demarsy, E., Schepens, I., Okajima, K., Hersch, M., Bergmann, S., Christie, J., Shimazaki, K.-I., Tokutomi, S., and Fankhauser, C.** (2012). Phytochrome Kinase Substrate 4 is phosphorylated by the phototropin 1 photoreceptor. *EMBO J.* **31**: 3457–67.
- Dulbecco, R.** (1949). Reactivation of Ultra-Violet-Inactivated Bacteriophage by Visible Light. *Nature* **163**: 949–950.
- El-Esawi, M., Glascoe, A., Engle, D., Ritz, T., Link, J., and Ahmad, M.** (2015). Cellular metabolites modulate in vivo signaling of arabidopsis cryptochrome-1. *Plant Signal. Behav.* **10**: 1–8.
- Elliott, R.C., Platten, J.D., Watson, J.C., and Reid, J.B.** (2004). Phytochrome regulation of pea phototropin. *J. Plant Physiol.* **161**: 265–70.
- Engelhard, C., Wang, X., Robles, D., Moldt, J., Essen, L.-O., Batschauer, A., Bittl, R., and Ahmad, M.** (2014a). Cellular metabolites enhance the light sensitivity of Arabidopsis cryptochrome through alternate electron transfer pathways. *Plant Cell* **26**: 4519–31.
- Engelhard, C., Wang, X., Robles, D., Moldt, J., Moldt, J., Batschauer, A., Bittl, R., and Ahmadb, M.** (2014b). Cellular metabolites enhance the light sensitivity of arabidopsis cryptochrome through alternate electron transfer pathwaysc. *Plant Cell* **26**: 4519–4531.
- Exner, V., Alexandre, C., Rosenfeldt, G., Alfarano, P., Nater, M., Cafilisch, A., Gruissem, W., Batschauer, A., and Hennig, L.** (2010). A gain-of-function mutation of Arabidopsis CRYPTOCHROME1 promotes flowering. *Plant Physiol.* **154**: 1633–1645.
- Folta, K.M. and Spalding, E.P.** (2001). Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant J.* **26**: 471–8.
- Fornara, F., Panigrahi, K.C.S., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Rühl, M., Jarillo, J.A., and Coupland, G.** (2009a). Arabidopsis DOF Transcription Factors Act Redundantly to Reduce CONSTANS Expression and Are Essential for a Photoperiodic Flowering

- Response. *Dev. Cell* **17**: 75–86.
- Fornara, F., Panigrahi, K.C.S., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Rühl, M., Jarillo, J.A., and Coupland, G.** (2009b). Arabidopsis DOF Transcription Factors Act Redundantly to Reduce CONSTANS Expression and Are Essential for a Photoperiodic Flowering Response. *Dev. Cell* **17**: 75–86.
- Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J., and Whitelam, G.C.** (2003). Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in arabidopsis. *Plant Physiol.*
- Franklin, K.A. and Whitelam, G.C.** (2005). Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Ann. Bot.*
- Froehlich, A.C., Chen, C.H., Belden, W.J., Madeti, C., Roenneberg, T., Merrow, M., Loros, J.J., and Dunlap, J.C.** (2010). Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell.*
- Fujiwara, S., Wang, L., Han, L., Suh, S.S., Salomé, P.A., McClung, C.R., and Somers, D.E.** (2008). Post-translational regulation of the Arabidopsis circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins. *J. Biol. Chem.* **283**: 23073–23083.
- Gao, J., Wang, X., Zhang, M., Bian, M., Deng, W., Zuo, Z., Yang, Z., Zhong, D., and Lin, C.** (2015). Trp triad-dependent rapid photoreduction is not required for the function of Arabidopsis CRY1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 9135–40.
- Gegeer, R.J., Casselman, A., Waddell, S., and Reppert, S.M.** (2008). Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature.*
- Giovani, B., Byrdin, M., Ahmad, M., and Brettel, K.** (2003). Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nat. Struct. Biol.*
- Gressel, J.** (1979). BLUE LIGHT PHOTORECEPTION. *Photochem. Photobiol.*
- Guo, H., Duong, H., Ma, N., and Lin, C.** (1999). The Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J.*
- Halliday, K.R., Stein, P.J., Chernoff, N., Wheeler, G.L., and Bitensky, M.W.** (1984). Limited trypsin proteolysis of photoreceptor GTP-binding protein. Light- and GTP-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.*
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X.,**

- Kreps, J.A., and Kay, S.A.** (2000). Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* (80-. ).
- Harris, S.R., Henbest, K.B., Maeda, K., Pannell, J.R., Timmel, C.R., Hore, P.J., and Okamoto, H.** (2009). Effect of magnetic fields on cryptochrome-dependent responses in Arabidopsis thaliana. *J. R. Soc. Interface*.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H., and Liu, Y.** (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* **297**: 840–3.
- Heijde, M. and Ulm, R.** (2013). Reversion of the Arabidopsis UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 1113–1118.
- Hennig, L., Stoddart, W.M., Dieterle, M., Whitelam, G.C., and Schäfer, E.** (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of arabidopsis. *Plant Physiol.*
- Hitomi, K.** (2000). Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of Synechocystis sp. PCC6803. *Nucleic Acids Res.*
- Hoffman, P.D., Batschauer, A., and Hays, J.B.** (1996). PHH1, a novel gene from Arabidopsis thaliana that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol. Gen. Genet.*
- Holm, M., Hardtke, C.S., Gaudet, R., and Deng, X.W.** (2001). Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of Arabidopsis COP1. *EMBO J.*
- Hsu, D.S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R.P., Todo, T., Wei, Y.F., and Sancar, A.** (1996). Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry*.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., and Briggs, W.R.** (1997). Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**: 2120–3.
- Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gärtner, W., Wilde, A., and Börner, T.** (1997). A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**: 663–663.
- Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R., and Kay, S.A.** (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in Arabidopsis. *Nature* **426**: 302–306.
- Immeln, D., Schlesinger, R., Heberle, J., and Kottke, T.** (2007). Blue light induces radical formation and autophosphorylation in the light-sensitive domain of Chlamydomonas cryptochrome. *J. Biol. Chem.*
- Inada, S., Ohgishi, M., Mayama, T., Okada, K., and Sakai, T.** (2004). RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with



- phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 887–896.
- Islam, S.D.M., Susdorf, T., Penzkofer, A., and Hegemann, P.** (2003). Fluorescence quenching of flavin adenine dinucleotide in aqueous solution by pH dependent isomerisation and photo-induced electron transfer. *Chem. Phys.* **295**: 137–149.
- Ito, S., Song, Y.H., and Imaizumi, T.** (2012). LOV Domain-Containing F-Box Proteins: Light-Dependent Protein Degradation Modules in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **5**: 1–10.
- Jarillo, J.A., Capel, J., Tang, R.H., Yang, H.Q., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Cashmore, A.R.** (2001a). An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* **410**: 487–490.
- Jarillo, J.A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Cashmore, A.R.** (2001b). Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410**: 952–4.
- Jones, A.M. and Edgerton, M.D.** (1994). The anatomy of phytochrome, a unique photoreceptor in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Jorns, M.S., Wang, B., and Jordan, S.P.** (1987). DNA repair catalyzed by *Escherichia coli* DNA photolyase containing only reduced flavin: elimination of the enzyme's second chromophore by reduction with sodium borohydride. *Biochemistry* **26**: 6810–6.
- Jung, J.H. et al.** (2016). Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science* (80-. ).
- Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., and Wada, M.** (2001). *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**: 2138–41.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., and Fankhauser, C.** (2010). Light-regulated plant growth and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **91**: 29–66.
- Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H., and Todo, T.** (1997). Molecular evolution of the photolyase-blue light photoreceptor family. *J. Mol. Evol.* **45**: 535–548.
- Kanegae, H., Tahir, M., Savazzini, F., Yamamoto, K., Yano, M., Sasaki, T., Kanegae, T., Wada, M., and Takano, M.** (2000). Rice NPH1 homologues, OsNPH1a and OsNPH1b, are differently photoregulated. *Plant Cell Physiol.* **41**: 415–23.
- Kang, C.Y., Lian, H.L., Wang, F.F., Huang, J.R., and Yang, H.Q.** (2009). Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.
- Karniol, B., Wagner, J.R., Walker, J.M., and Vierstra, R.D.** (2005). Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors.

- Biochem. J. **392**: 103–116.
- Kelner, A.** (1949). Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **35**: 73–79.
- Kennis, J.T.M., van Stokkum, I.H.M., Crosson, S., Gauden, M., Moffat, K., and van Grondelle, R.** (2004). The LOV2 domain of phototropin: a reversible photochromic switch. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 4512–3.
- Kevei, É. and Nagy, F.** (2003). Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiol. Plant.*
- Kevei, E., Schafer, E., and Nagy, F.** (2007). Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *J. Exp. Bot.*
- Kim, J., Geng, R., Gallenstein, R.A., and Somers, D.E.** (2013). The F-box protein ZEITLUPE controls stability and nucleocytoplasmic partitioning of GIGANTEA. *Development* **140**: 4060–4069.
- Kim, W.-Y., Fujiwara, S., Suh, S.-S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H.G., and Somers, D.E.** (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* **449**: 356–360.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., and Shimazaki, K.** (2001). phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**: 656–660.
- Kinoshita, T., Ono, N., Hayashi, Y., Morimoto, S., Nakamura, S., Soda, M., Kato, Y., Ohnishi, M., Nakano, T., Inoue, S.I., and Shimazaki, K.I.** (2011). FLOWERING LOCUS T regulates stomatal opening. *Curr. Biol.*
- Kleine, T., Lockhart, P., and Batschauer, A.** (2003). An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J.*
- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K., and Batschauer, A.** (1999). Nuclear localization of the Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J.*
- Kneip, C., Hildebrandt, P., Schlamann, W., Braslavsky, S.E., Mark, F., and Schaffner, K.** (1999). Protonation state and structural changes of the tetrapyrrole chromophore during the P(r) → P(fr) phototransformation of phytochrome: A resonance raman spectroscopic study. *Biochemistry.*
- Kondoh, M., Shiraishi, C., Müller, P., Ahmad, M., Hitomi, K., Getzoff, E.D., and Terazima, M.** (2011). Light-induced conformational changes in full-length arabidopsis thaliana cryptochrome. *J. Mol. Biol.*
- Kong, S.-G., Suetsugu, N., Kikuchi, S., Nakai, M., Nagatani, A., and Wada, M.** (2013). Both Phototropin 1 and 2 Localize on the Chloroplast Outer Membrane with Distinct

- Localization Activity. *Plant Cell Physiol.* **54**: 80–92.
- Kong, S.-G., Suzuki, T., Tamura, K., Mochizuki, N., Hara-Nishimura, I., and Nagatani, A.** (2006). Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant J.* **45**: 994–1005.
- Koornneef, M., Rolff, E., and Spruit, C.J.P.** (1980). Genetic Control of Light-inhibited Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lau, O.S. and Deng, X.W.** (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci.* **17**: 584–593.
- Laubinger, S., Fittinghoff, K., and Hoecker, U.** (2004). The SPA quartet: A family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.
- Laubinger, S., Marchal, V., Gentillhomme, J., Wenkel, S., Adrian, J., Jang, S., Kulajta, C., Braun, H., Coupland, G., and Hoecker, U.** (2006). *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development*.
- Li, Y.F., Sancar, A., and Heelis, P.F.** (1991). Active Site of DNA Photolyase: Tryptophan-306 Is the Intrinsic Hydrogen Atom Donor Essential for Flavin Radical Photoreduction and DNA Repair in Vitro. *Biochemistry* **30**: 6322–6329.
- Lian, H.L., He, S.B., Zhang, Y.C., Zhu, D.M., Zhang, J.Y., Jia, K.P., Sun, S.X., Li, L., and Yang, H.Q.** (2011). Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes Dev.*
- Liedvogel, M., Maeda, K., Henbest, K., Schleicher, E., Simon, T., Timmel, C.R., Hore, P.J., and Mouritsen, H.** (2007). Chemical magnetoreception: Bird cryptochrome 1a is excited by blue light and forms long-lived radical-pairs. *PLoS One*.
- Lin, C.** (2002). Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* **14 Suppl**: S207-25.
- Lin, C., Ahmad, M., and Cashmore, A.R.** (1996). *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J.*
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., and Cashmore, A.R.** (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

- Liscum, E. and Briggs, W.R.** (1995a). Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* **7**: 473–85.
- Liscum, E. and Briggs, W.R.** (1995b). Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* **7**: 473–485.
- Liu, B., Yang, Z., Gomez, A., Liu, B., Lin, C., and Oka, Y.** (2016). Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* **129**: 137–148.
- Liu, B., Zuo, Z., Liu, H., Liu, X., and Lin, C.** (2011a). *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Dev.*
- Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M., and Lin, C.** (2011b). The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Sci.* **16**: 684–691.
- Liu, Q. et al.** (2020). Photooligomerization Determines Photosensitivity and Photoreactivity of Plant Cryptochromes. *Mol. Plant.*
- Losi, A., Polverini, E., Quest, B., and Gärtner, W.** (2002). First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys. J.* **82**: 2627–34.
- Ma, D., Li, X., Guo, Y., Chu, J., Fang, S., Yan, C., Noel, J.P., and Liu, H.** (2016). Cryptochrome 1 interacts with PIF4 to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Malhotra, K., Kim, S.T., Batschauer, A., Dawut, L., and Sancar, A.** (1995). Putative Blue-Light Photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a High Degree of Sequence Homology to DNA Photolyase Contain the Two Photolyase Cofactors but Lack DNA Repair Activity. *Biochemistry.*
- Mas, P., Devlin, P.F., Panda, S., and Kay, S.A.** (2000). Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature.*
- Más, P., Kim, W.-Y., Somers, D.E., and Kay, S.A.** (2003). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **426**: 567–570.
- Monte, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Zhang, Y., Li, X., Young, J., Austin-Phillips, S., and Quail, P.H.** (2003). Isolation and characterization of phyC mutants in *Arabidopsis* reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell.*
- Müller, F.** (1991). *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* (CRC Press).
- Müller, P., Bouly, J.-P., Hitomi, K., Balland, V., Getzoff, E.D., Ritz, T., and Brettel, K.** (2015). ATP Binding Turns Plant Cryptochrome Into an Efficient Natural Photoswitch. *Sci. Rep.* **4**: 5175.
- Müller, P., Bouly, J.P., Hitomi, K., Balland, V., Getzoff, E.D., Ritz, T., and Brettel, K.** (2014). ATP binding turns plant cryptochrome into an efficient natural photoswitch. *Sci.*

Rep. 4.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol* **51**: 263–273.
- Neff, M.M. and Chory, J.** (1998). Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during arabidopsis development. *Plant Physiol*.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A., and Bartel, B.** (2000). FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in Arabidopsis. *Cell* **101**: 331–340.
- Niemann, N.** (2016). Masterthesis: "Characterisation of the Interaction between Arabidopsis thaliana Cryptochrome 1 and Adenosine Triphosphate"
- Oberpichler, I., Pierik, A.J., Wesslowski, J., Pokorny, R., Rosen, R., Vugman, M., Zhang, F., Neubauer, O., Ron, E.Z., Batschauer, A., and Lamparter, T.** (2011). A photolyase-like protein from agrobacterium tumefaciens with an iron-sulfur cluster. *PLoS One* **6**.
- Orth, C., Niemann, N., Hennig, L., Essen, L.O., and Batschauer, A.** (2017). Hyperactivity of the Arabidopsis cryptochrome (cry1) L407F mutant is caused by a structural alteration close to the cry1 ATP-binding site. *J. Biol. Chem.* **292**: 12906–12920.
- Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Ning, W., and Deng, X.W.** (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*.
- Özgür, S. and Sancar, A.** (2006). Analysis of autophosphorylating kinase activities of arabidopsis and human cryptochromes. *Biochemistry*.
- Öztürk, N., Kao, Y.T., Selby, C.P., Kavakli, I.H., Partch, C.L., Zhong, D., and Sancar, A.** (2008). Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*. *Biochemistry*.
- Pacín, M., Semmoloni, M., Legris, M., Finlayson, S.A., and Casal, J.J.** (2016). Convergence of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR signalling during shade avoidance. *New Phytol*.
- Palfey, B.A. and Massey, V.** (1998). Flavin-dependent enzymes. In *Comprehensive biological catalysis*, M. Sinnott, ed (Academic Press: London), pp. 84–100.
- Park, H.W., Kim, S.T., Sancar, A., and Deisenhofer, J.** (1995). Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science* (80-. ).
- Partch, C.L., Clarkson, M.W., Özgür, S., Lee, A.L., and Sancar, A.** (2005). Role of

- structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry* **44**: 3795–3805.
- Pedmale, U. V., Huang, S.S.C., Zander, M., Cole, B.J., Hetzel, J., Ljung, K., Reis, P.A.B., Sridevi, P., Nito, K., Nery, J.R., Ecker, J.R., and Chory, J. (2016).** Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light. *Cell*.
- Pedmale, U. V et al. (2017).** Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light. **164**: 233–245.
- Pfeifer, A., Mathes, T., Lu, Y., Hegemann, P., and Kottke, T. (2010).** Blue light induces global and localized conformational changes in the kinase domain of full-length phototropin. *Biochemistry* **49**: 1024–32.
- Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A., and Essen, L.-O. (2008).** Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 21023–21027.
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S., and Matthies, H. (1975).** Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates. *Acta Biol. Med. Ger.* **34**: 1441–6.
- Pudasaini, A. and Zoltowski, B.D. (2013).** Zeitlupe senses blue-light fluence to mediate circadian timing in *arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* **52**: 7150–7158.
- Purcell, E.B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D.C., Fiebig, A., and Crosson, S. (2007).** A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 18241–6.
- Quail, P.H. (2002).** Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Reymond, P., Short, T.W., and Briggs, W.R. (1992).** Blue Light Activates a Specific Protein Kinase in Higher Plants. *Plant Physiol.* **100**: 655–661.
- Ritz, T., Ahmad, M., Mouritsen, H., Wiltschko, R., and Wiltschko, W. (2010).** Photoreceptor-based magnetoreception: Optimal design of receptor molecules, cells, and neuronal processing. *J. R. Soc. Interface* **7**.
- Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., and Ulm, R. (2011).** Perception of UV-B by the *arabidopsis* UVR8 protein. *Science* (80-. ).
- Roberts, D., Pedmale, U. V, Morrow, J., Sachdev, S., Lechner, E., Tang, X., Zheng, N., Hannink, M., Genschik, P., and Liscum, E. (2011).** Modulation of Phototropic Responsiveness in *Arabidopsis* through Ubiquitination of Phototropin 1 by the CUL3-

- Ring E3 Ubiquitin Ligase CRL3NPH3. *Plant Cell* **23**: 3627–3640.
- Rockwell, N.C., Su, Y.-S., and Lagarias, J.C.** (2006). PHYTOCHROME STRUCTURE AND SIGNALING MECHANISMS. *Annu. Rev. Plant Biol.*
- Rolauffs, S., Fackendahl, P., Sahm, J., Fiene, G., and Hoecker, U.** (2012). Arabidopsis COP1 and SPA genes are essential for plant elongation but not for acceleration of flowering time in response to a low red light to far-red light ratio. *Plant Physiol.*
- Rosenfeldt, G., Viana, R.M., Mootz, H.D., Von Arnim, A.G., and Batschauer, A.** (2008). Chemically induced and light-independent cryptochrome photoreceptor activation. *Mol. Plant* **1**: 4–14.
- Ruddat, A., Schmidt, P., Gatz, C., Braslavsky, S.E., Gärtner, W., and Schaffner, K.** (1997). Recombinant type A and B phytochromes from potato. Transient absorption spectroscopy. *Biochemistry.*
- Rüdiger, W., Thummler, F., Cmiel, E., and Schneider, S.** (1983). Chromophore structure of the physiologically active form (Pfr) of phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Rupert, C.S.** (1962a). Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. I. Kinetics of the reaction. *J. Gen. Physiol.* **45**: 703–24.
- Rupert, C.S.** (1962b). Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. II. Formation of an enzyme-substrate complex. *J. Gen. Physiol.* **45**: 725–41.
- Rupert, C.S.** (1960). Photoreactivation of Transforming DNA by an Enzyme from Bakers' Yeast. *J. Gen. Physiol.* **43**: 573–595.
- Rupert, C.S., Goodgal, S.H., and Herriott, R.M.** (1958). Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated Hemophilus influenzae transforming factor. *J. Gen. Physiol.* **41**: 451–471.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., and Okada, K.** (2001). Arabidopsis nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation.
- Sakai, T., Wada, T., Ishiguro, S., and Okada, K.** (2000). RPT2: A Signal Transducer of the Phototropic Response in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 225–236.
- Sakamoto, K. and Briggs, W.R.** (2002). Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1. *Plant Cell* **14**: 1723–1735.
- Salomon, M., Knieb, E., von Zeppelin, T., and Rüdiger, W.** (2003). Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. *Biochemistry* **42**: 4217–25.
- Sancar, A.** (2016). Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture). *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**: 8502–8527.

- Sancar, A.** (2004). Photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Adv. Protein Chem.* **69**: 73–100.
- Sancar, A.** (2008). Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary. *J. Biol. Chem.* **283**: 32153–7.
- Sancar, G.B., Smith, F.W., and Heelis, P.F.** (1987). Purification of the yeast PHR1 photolyase from an *Escherichia coli* overproducing strain and characterization of the intrinsic chromophores of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **262**: 15457–15465.
- Sancar, G.B., Jorns, M.S., Paynes, G., Fluker, D.J., Rupert, C.S., and Sancar, A.** THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Action Mechanism of *Escherichia coli* DNA Photolyase 111. PHOTOLYSIS OF THE ENZYME-SUBSTRATE COMPLEX AND THE ABSOLUTE ACTION SPECTRUM\*.
- Sang, Y., Li, Q.-H., Rubio, V., Zhang, Y.-C., Mao, J., Deng, X.-W., and Yang, H.-Q.** (2005). N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of *Arabidopsis* CRYPTOCHROME 1. *Plant Cell* **17**: 1569–84.
- Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A., and Imaizumi, T.** (2007). FKF1 and GIGANTEA Complex Formation Is Required for Day-Length Measurement in *Arabidopsis*. *Science* (80-. ). **318**: 261–265.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M., and Kay, S.A.** (2001a). A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2659–2670.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M., and Kay, S.A.** (2001b). A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2659–2670.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M., and Kay, S.A.** (2001c). A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2659–2670.
- Schwerdtfeger, C. and Linden, H.** (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J.* **22**: 4846–55.
- Selby, C.P. and Sancar, A.** (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 17696–17700.
- Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T.C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G.C., and Lin, C.** (2002). Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature*.
- Sharrock, R.A. and Clack, T.** (2004). Heterodimerization of type II phytochromes in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Sharrock, R.A. and Quail, P.H.** (1989). Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis*



- thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.*
- Shinomura, T., Nagatani, A., Chory, J., and Furuya, M.** (1994). The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A. *Plant Physiol.*
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., and Furuya, M.** (1996). Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Smith, H., Xu, Y., and Quail, P.H.** (1997). Antagonistic but complementary actions of phytochromes A and B allow optimum seedling de-etiolation. *Plant Physiol.*
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., and Kay, S.A.** (2000). ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* **101**: 319–29.
- Song, Y.H., Smith, R.W., To, B.J., Millar, A.J., and Imaizumi, T.** (2012). FKF1 Conveys Timing Information for CONSTANS Stabilization in Photoperiodic Flowering. *Science* (80-. ). **336**: 1045–1049.
- Spalding, E.P.** (2013). Diverting the downhill flow of auxin to steer growth during tropisms. *Am. J. Bot.* **100**: 203–14.
- Stanewsky, R.** (2002). Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.*
- Studier, F.W.** (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*
- Sullivan, J.** (2003). From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev. Biol.* **260**: 289–297.
- Tagua, V.G., Pausch, M., Eckel, M., Gutiérrez, G., Miralles-Durán, A., Sanz, C., Eslava, A.P., Pokorný, R., Corrochano, L.M., and Batschauer, A.** (2015). Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**: 15130–15135.
- Takase, T., Nishiyama, Y., Tanihigashi, H., Ogura, Y., Miyazaki, Y., Yamada, Y., and Kiyosue, T.** (2011). LOV KELCH PROTEIN2 and ZEITLUPE repress *Arabidopsis* photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F - BOX1. *Plant J.* **67**: 608–621.
- Takemiya, A., Sugiyama, N., Fujimoto, H., Tsutsumi, T., Yamauchi, S., Hiyama, A., Tada, Y., Christie, J.M., and Shimazaki, K.** (2013). Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat. Commun.* **4**: ncomms3094.
- Todo, T.** (1999). Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family.

- Mutat. Res. **434**: 89–97.
- Tokutomi, S., Matsuoka, D., and Zikihara, K.** (2008). Molecular structure and regulation of phototropin kinase by blue light. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1784**: 133–142.
- Ulijasz, A.T., Cornilescu, G., von Stetten, D., Kaminski, S., Mroginski, M.A., Zhang, J., Bhaya, D., Hildebrandt, P., and Vierstra, R.D.** (2008). Characterization of two thermostable cyanobacterial phytochromes reveals global movements in the chromophore-binding domain during photoconversion. *J. Biol. Chem.* **283**: 21251–66.
- Veluchamy, S. and Rollins, J.A.** (2008). A CRY-DASH-type photolyase/cryptochrome from *Sclerotinia sclerotiorum* mediates minor UV-A-specific effects on development. *Fungal Genet. Biol.*
- Wada, M., Kagawa, T., and Sato, Y.** (2003). C H LOROPLAST M OVEMENT. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 455–468.
- Wang, H., Ma, L.G., Li, J.M., Zhao, H.Y., and Xing Wang Deng** (2001). Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* (80-. ).
- Wang, Q. et al.** (2016). Photoactivation and inactivation of Arabidopsis cryptochrome 2. *Science* (80-. ).
- Wang, W. et al.** (2018). Photoexcited CRYPTOCHROME1 interacts with dephosphorylated bes1 to regulate brassinosteroid signaling and photomorphogenesis in arabidopsis. *Plant Cell* **30**: 1989–2005.
- Wiltschko, W. and Wiltschko, R.** (2002). Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. *Naturwissenschaften*.
- Yang, H.-Q., Tang, R.-H., and Cashmore, A.R.** (2001). The Signaling Mechanism of Arabidopsis CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *Plant Cell*.
- Yang, H.-Q., Wu, Y.-J., Tang, R.-H., Liu, D., Liu, Y., and Cashmore, A.R.** (2000). The C Termini of Arabidopsis Cryptochromes Mediate a Constitutive Light Response. *Cell* **103**: 815–827.
- Yang, J. and Wang, H.** (2006). The central coiled-coil domain and carboxyl-terminal WD-repeat domain of Arabidopsis SPA1 are responsible for mediating repression of light signaling. *Plant J.*
- Yang, Z., Liu, B., Su, J., Liao, J., Lin, C., and Oka, Y.** (2017). Cryptochromes Orchestrate Transcription Regulation of Diverse Blue Light Responses in Plants. *Photochem. Photobiol.* **93**: 112–127.
- Yasuil, A., Eker3, A.P.M., Yasuhira1, S., Yajima1 ', H., Kobayashi ', T., Takao ', M.,**

- and Oikawa, A.** (1994). A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO J.* **13**: 6143–6151.
- Yoshii, T., Ahmad, M., and Helfrich-Förster, C.** (2009). Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity of *Drosophila*'s circadian clock. *PLoS Biol.* **7**: 0813–0819.
- Yu, X., Klejnot, J., Zhao, X., Shalitin, D., Maymon, M., Yang, H., Lee, J., Liu, X., Lopez, J., and Lina, C.** (2007). Arabidopsis cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *Plant Cell*.
- von Zadow, A., Ignatz, E., Pokorny, R., Essen, L.O., and Klug, G.** (2016). Rhodobacter sphaeroides CryB is a bacterial cryptochrome with (6–4) photolyase activity. *FEBS J.* **283**: 4291–4309.
- Zeugner, A., Byrdin, M., Bouly, J.P., Bakrim, N., Giovani, B., Brettel, H., and Ahmad, M.** (2005). Light-induced electron transfer in Arabidopsis cryptochrome-1 correlates with in vivo function. *J. Biol. Chem.* **280**: 19437–19440.
- Zhang, T. and Folta, K.M.** (2012). Green light signaling and adaptive response. *Plant Signal. Behav.* **7**: 75–8.
- Zikihara, K., Iwata, T., Matsuoka, D., Kandori, H., Todo, T., and Tokutomi, S.** (2006). Photoreaction cycle of the light, oxygen, and voltage domain in FKF1 determined by low-temperature absorption spectroscopy. *Biochemistry* **45**: 10828–10837.

## Anhang 1

DNA- und Proteinsequenz von cry1WT PHR kloniert und exprimiert in pACycDuet1:

6x N-terminaler His-Tag

Mutation auf DNA-Ebene

Mutation auf Proteinebene

DNA-Sequenz:

```
atgggcagcagccatcacatcacaccacagccaggatccgaattcgtctggttctgtatctggttggttctggtggtgtagtattgt
atggtttagaagagatcttaggggtgaagataatccagcttagcagcagcagtaagagctggccagtgattgctctgtttgttgggcac
cagaagaagaaggacactatcatccaggtagggttctaggtggctcaagaacagttggctcagcttgattcttctttagaagtctt
ggtactgtcttatcaccaagagatctactgatagtgttgccttcttcttgatgttgtaaaccactggtgcttctcagatcttctcaaccatt
gtatgatccattgtcttgggtgcgtgatcccgagctaaagatgtttgacggcgcaaggcatagcgggtcgatcattcaacgcagacttg
ctttatgagccatgggaagtgactgatgaattaggccgtcttctctatgtttgctgcgtttgggagagatgtcttagtatgccttatgacc
ctgagtctctcttctccacctaagaagatcatttcaggggatgtgtctaaatgtttgcggtatccattggtgttgaggatgactctgaga
aaggaagcaatgcacttctggctcgtgcttgggtccttgatggagtaatggtgataaagctctcacaacgtttataaacggtccattgctt
gaatactctaagaaccgcagaaaagccgatagtgtacaacctcgtttcttctccacacttgcattttggggaagtgagtgtgagaaaag
ttttcatcttggtcggatcaaacaggtcgcgtgggcaaacgaaggaaacgaggccggggaagaaagcgtgaatctttctgaaatcta
ttggtctcaggagattcttaggtacataagtttaaccatccatattcccatgaaagaccacttcttgccatctaaagtcttcccttgggc
tgtggatgagaactattcaaggcatggaggcaaggccggactggatatccgttggtcgatgccgggatgagagagttagggctact
ggttggtgcatgatcgcataagagtagttgttcaagctcttgttaaagtgttcaattaccatggagatgggggatgaagtatttctgg
gacacacttcttgatcggtatttagaaagcgatgctcttgggtggcaatacattaccggtactctcccgatagccgggagttgatcgca
tagataaccctcagttgaagggtacaagttgatccaaatggtgaatacgttaaggcgatggcttctgaactctctagactcccacaga
ctggatacatcatccgtggaacgcacctgagtcggttcttcaagctgctggatcagcttgatcaaaactatcctctaccaattgtaggat
tagacgaagcaaaagcacggctcatgaagcgctttcacagatgtggcaactagaagctgcttcaagagctgcaatagagaacggatc
cgaagaaggataa
```

Aminosäuresequenz:

MGSSHHHHHSQDPNSSGSVSGCGSGGCSIVWFRRDLRVEDNPALAAAVRAGPVIA  
 LFVWAPEEEGHYHPGRVSRWWLKNSLAQLDSSLRSLGTCLITKRSTDSVASLLDVVK  
 STGASQIFFNHLVDPLSLVRDHRAKDVLT AQGIAVRSFNADLLYEPWEVTDELGRPFS  
 MFAAFWERCLSMFYDPESPLLPPKKIISGDVSKCVADPLVFEDDSEKGSNALLARAW  
 SPGWSNGDKALTTFINGPLLEYSKNRRKADSATTSFLSPHLHFGEVSVRKVFHLVRIK  
 QVAWANEGNEAGEESVNLFLKSIGLREYSRYISFNHPYSHERPLLGHLLKFFPWAVDE  
 NYFKAWRQGRTGYPLVDAGMRELWATGWLHDIRVVVSSFFVKVLQLPWRWGMK  
 YFWDTLDDADLES DALGWQYITGTL PDSREFDRIDNPQFEGYKFDPNGEYVRRWLPE  
 LSRLPTDWIHPWNAPESVLQAAGIELGSNYPLPIVGLDEAKARLHEALSQM WQLEA  
 ASRAAIENGSEEG-

atg ggc agc agc cat cac cat cat cac cac agc cag gat ccg aat tcg tct ggt tct gta  
 M G S S H H H H H S Q D P N S S G S V  
 tct ggt tgt ggt tct ggt ggt tgt agt att gta tgg ttt aga aga gat ctt agg gtt gaa  
 S G C G S G G C S I V W F R R D L R V E  
 gat aat cca gct tta gca gca gca gta aga gct ggt cca gtg att gct ctg ttt gtt tgg  
 D N P A L A A A V R A G P V I A L F V W  
 gca cca gaa gaa gaa gga cac tat cat cca ggt agg gtt tct agg tgg tgg ctc aag aac  
 A P E E E G H Y H P G R V S R W W L K N  
 agt ttg gct cag ctt gat tct tct ctt aga agt ctt ggt act tgt ctt atc acc aag aga  
 S L A Q L D S S L R S L G T C L I T K R  
 tct act gat agt gtt gct tct ctt ctt gat gtt gtt aaa tcc act ggt gct tct cag atc  
 S T D S V A S L L D V V K S T G A S Q I  
 ttc ttc aac cat ttg tat gat cca ttg tct ttg gtg cgt gat cac cga gct aaa gat gtt  
 F F N H L Y D P L S L V R D H R A K D V  
 ttg acg gcg caa ggc ata gcg gtt cga tca ttc aac gca gac ttg ctt tat gag cca tgg  
 L T A Q G I A V R S F N A D L L Y E P W  
 gaa gtg act gat gaa tta ggc cgt cct ttc tct atg ttt gct gcg ttt tgg gag aga tgt  
 E V T D E L G R P F S M F A A F W E R C  
 ctt agt atg cct tat gac cct gag tct cct ctt ctt cca cct aag aag atc att tca ggg  
 L S M P Y D P E S P L L P P K K I I S G

gat gtg tct aaa tgt gtt gcg gat cca ttg gtg ttt gag gat gac tct gag aaa gga agc  
D V S K C V A D P L V F E D D S E K G S  
aat gca ctt ctg gct cgt gct tgg tct cct gga tgg agt aat ggt gat aaa gct ctc aca  
N A L L A R A W S P G W S N G D K A L T  
acg ttt ata aac ggt cca ttg ctt gaa tac tct aag aac cgc aga aaa gcc gat agt gct  
T F I N G P L L E Y S K N R R K A D S A  
aca acc tcg ttt ctt tct cca cac ttg cat ttt ggg gaa gtg agt gtg aga aaa gtt ttt  
T T S F L S P H L H F G E V S V R K V F  
cat ctt gtt cgg atc aaa cag gtc gcg tgg gca aac gaa gga aac gag gcc ggg gaa gaa  
H L V R I K Q V A W A N E G N E A G E E  
agc gtg aat ctt ttc ctg aaa tct att ggt ctc agg gag tat tct agg tac ata agt ttt  
S V N L F L K S I G L R E Y S R Y I S F  
aac cat cca tat tcc cat gaa aga cca ctt ctt ggc cat cta aag ttc ttc cct tgg gct  
N H P Y S H E R P L L G H L K F F P W A  
gtg gat gag aac tat ttc aag gca tgg agg caa ggc cgg act gga tat ccg ttg gtc gat  
V D E N Y F K A W R Q G R T G Y P L V D  
gcc ggg atg aga gag tta tgg gct act ggt tgg ttg cat gat cgc ata aga gta gtt gtt  
A G M R E L W A T G W L H D R I R V V V  
tca agc ttc ttt gtt aaa gtg ctt caa tta cca tgg aga tgg ggg atg aag tat ttc tgg  
S S F F V K V L Q L P W R W G M K Y F W  
gac aca ctt ctt gat gcg gat tta gaa agc gat gct ctt ggt tgg caa tac att acc ggt  
D T L L D A D L E S D A L G W Q Y I T G  
act ctc ccg gat agc cgg gag ttt gat cgc ata gat aac cct cag ttt gaa ggg tac aag  
T L P D S R E F D R I D N P Q F E G Y K  
ttt gat cca aat ggt gaa tac gta agg cga tgg ctt cct gaa ctc tct aga ctc ccg aca  
F D P N G E Y V R R W L P E L S R L P T  
gac tgg ata cat cat ccg tgg aac gca cct gag tcc gtt ctt caa gct gct ggt atc gag  
D W I H H P W N A P E S V L Q A A G I E  
ctt gga tca aac tat cct cta cca att gta gga tta gac gaa gca aaa gca cgg ctt cat  
L G S N Y P L P I V G L D E A K A R L H  
gaa gcg ctt tca cag atg tgg caa cta gaa gct gct tca aga gct gca ata gag aac gga  
E A L S Q M W Q L E A A S R A A I E N G  
tcc gaa gaa gga taa  
S E E G -

## Anhang 2

DNA- und Proteinsequenz von *cryII407F* PHR kloniert und exprimiert in pACycDuet1:

6x N-terminaler His-Tag

Mutation auf DNA-Ebene

Mutation auf Proteinebene

DNA-Sequenz:

atgggcagcagccatcaccatcatcaccacagccaggatccgaattcgtctggttctgtatctggttggttctggtggttagtattgt  
atggtttagaagagatcttagggtgaagataatccagctttagcagcagcagtaagagctggtccagtgattgctctgtttgttgggcac  
cagaagaagaaggacactatcatccaggtagggttctaggtggtggctcaagaacagtttggtcagcttgattcttctcttagaagtctt  
ggtacttgccttatcaccaagagatctactgatatgttgcttctcttctgatgttgtaaataccactggtgcttctcagatcttctcaaccattt  
gtatgatccattgtctttggtgcgtgatccaggagctaaagatgtttgacggcgcaaggcatagcggtcgatcattcaacgcagacttg  
ctttatgagccatgggaagtgactgatgaattaggccgtcttctctatgtttgctgcgtttgggagagatgtcttagtatgccttatgacc  
ctgagtctctcttctccacctaagaagatcattcaggggatgtgtctaaatgtgtgcggatccattggtgttgaggatgactctgaga  
aaggaagcaatgcacttctggctcgtgcttggtctcctggatggagtaatggtgataaagctctcacaacgtttataaacggtccattgctt  
gaactactaagaaccgcagaaaagccgatagtgtacaacctcgtttcttctccacacttgcattttggggaagtgagtgtgagaaaaag  
ttttcatcttgttcggatcaaacaggtcgcgtgggcaaacgaaggaaacgaggccggggaagaaagcgtgaatctttctgaaatcta  
ttggtctcaggagattcttaggtacataagttttaaccatccatattcccatgaaagaccacttcttgccatctaaagttcttcccttgggc  
tgtggatgagaactatttcaaggcatggaggcaaggccggactggatatccgttggtcgcgatgccgggatgagagagttagggctact  
ggttggttgcgatgcataagagtagttgttcaagcttcttgttaaagtgttcaattaccatggagatgggggatgaagtatttctgg  
gacacacttcttgatgcggatttagaaagcgatgctcttggttggaatacattaccggtacttcccgatagccgggagttgatcgc  
agataacccctcagttgaagggtacaagttgatccaaatggtgaatacgttaaggcgatggcttctgaactctctagactcccgacaga  
ctggatacatcatccgtggaacgcacctgagtcggttcttcaagctgctggatcgagcttgatcaaactatcctctaccaattgtaggat  
tagacgaagcaaaagcacggcttcatgaagcgcttccacagatgtggcaactagaagctgcttcaagagctgcaatagagaacggatc  
cgaagaaggataa

## Aminosäuresequenz:

MGSSHHHHHSQDPNSSGSVSGCGSGGCSIVWFRRDLRVEDNPALAAVRAGPVIA  
 LFVWAPEEEGHYHPGRVSRWWLKNSLAQLDSSLRSLGTCLITKRSTDSVASLLDVVK  
 STGASQIFFNHLVDPLSLVRDHRAKDVLTAQGI AVRSFNADLLYEPWEVTDELGRPFS  
 MFAAFWERCLSMFYDPESPLLPPKKIISGDVSKCVADPLVFEDDSEKGSNALLARAW  
 SPGWSNGDKALTTFINGPLLEYSKNRRKADSATTSFLSPHLHFGEVSVRKVFHLVRIK  
 QVAWANEGNEAGEESVNLFLKSIGLREYSRYISFNHPYSHRPLLGHLLKFFPWAVDE  
 NYFKAWRQGRTGYPLVDAGMRELWATGWLHDIRV VVSSFFVKVLQLPWRWGMK  
 YFWDTLDDADLES DALGWQYITGT E PDSREFDRIDNPQFEGYKFDPNGEYVRRWLPE  
 LSRLPTDWIHPWNAPESVLQAAGIELGSNYPLPIVGLDEAKARLHEALSQMWQLEA  
 ASRAAIENGSEEG-

atg ggc agc agc cat cac cat cat cac cac agc cag gat ccg aat tcg tct ggt tct gta  
 M G S S H H H H H S Q D P N S S G S V  
 tct ggt tgt ggt tct ggt ggt tgt agt att gta tgg ttt aga aga gat ctt agg gtt gaa  
 S G C G S G G C S I V W F R R D L R V E  
 gat aat cca gct tta gca gca gca gta aga gct ggt cca gtg att gct ctg ttt gtt tgg  
 D N P A L A A A V R A G P V I A L F V W  
 gca cca gaa gaa gaa gga cac tat cat cca ggt agg gtt tct agg tgg tgg etc aag aac  
 A P E E E G H Y H P G R V S R W W L K N  
 agt ttg gct cag ctt gat tct tct ctt aga agt ctt ggt act tgt ctt atc acc aag aga  
 S L A Q L D S S L R S L G T C L I T K R  
 tct act gat agt gtt gct tct ctt ctt gat gtt gtt aaa tcc act ggt gct tct cag atc  
 S T D S V A S L L D V V K S T G A S Q I  
 ttc ttc aac cat ttg tat gat cca ttg tct ttg gtg cgt gat cac cga gct aaa gat gtt  
 F F N H L Y D P L S L V R D H R A K D V  
 ttg acg gcg caa ggc ata gcg gtt cga tca ttc aac gca gac ttg ctt tat gag cca tgg  
 L T A Q G I A V R S F N A D L L Y E P W  
 gaa gtg act gat gaa tta ggc cgt cct ttc tct atg ttt gct gcg ttt tgg gag aga tgt  
 E V T D E L G R P F S M F A A F W E R C  
 ctt agt atg cct tat gac cct gag tct cct ctt ctt cca cct aag aag atc att tca ggg  
 L S M P Y D P E S P L L P P K K I I S G  
 gat gtg tct aaa tgt gtt gcg gat cca ttg gtg ttt gag gat gac tct gag aaa gga agc  
 D V S K C V A D P L V F E D D S E K G S



aat gca ctt ctg gct cgt gct tgg tct cct gga tgg agt aat ggt gat aaa gct ctc aca  
N A L L A R A W S P G W S N G D K A L T  
acg ttt ata aac ggt cca ttg ctt gaa tac tct aag aac cgc aga aaa gcc gat agt gct  
T F I N G P L L E Y S K N R R K A D S A  
aca acc tgc ttt ctt tct cca cac ttg cat ttt ggg gaa gtg agt gtg aga aaa gtt ttt  
T T S F L S P H L H F G E V S V R K V F  
cat ctt gtt cgg atc aaa cag gtc gcg tgg gca aac gaa gga aac gag gcc ggg gaa gaa  
H L V R I K Q V A W A N E G N E A G E E  
agc gtg aat ctt ttc ctg aaa tct att ggt ctc agg gag tat tct agg tac ata agt ttt  
S V N L F L K S I G L R E Y S R Y I S F  
aac cat cca tat tcc cat gaa aga cca ctt ctt ggc cat cta aag ttc ttc cct tgg gct  
N H P Y S H E R P L L G H L K F F P W A  
gtg gat gag aac tat ttc aag gca tgg agg caa ggc cgg act gga tat ccg ttg gtc gat  
V D E N Y F K A W R Q G R T G Y P L V D  
gcc ggg atg aga gag tta tgg gct act ggt tgg ttg cat gat cgc ata aga gta gtt gtt  
A G M R E L W A T G W L H D R I R V V V  
tca agc ttc ttt gtt aaa gtg ctt caa tta cca tgg aga tgg ggg atg aag tat ttc tgg  
S S F F V K V L Q L P W R W G M K Y F W  
gac aca ctt ctt gat gcg gat tta gaa agc gat gct ctt ggt tgg caa tac att acc ggt  
D T L L D A D L E S D A L G W Q Y I T G  
act ttc ccg gat agc cgg gag ttt gat cgc ata gat aac cct cag ttt gaa ggg tac aag  
T F P D S R E F D R I D N P Q F E G Y K  
ttt gat cca aat ggt gaa tac gta agg cga tgg ctt cct gaa ctc tct aga ctc ccg aca  
F D P N G E Y V R R W L P E L S R L P T  
gac tgg ata cat cat ccg tgg aac gca cct gag tcc gtt ctt caa gct gct ggt atc gag  
D W I H H P W N A P E S V L Q A A G I E  
ctt gga tca aac tat cct cta cca att gta gga tta gac gaa gca aaa gca cgg ctt cat  
L G S N Y P L P I V G L D E A K A R L H  
gaa gcg ctt tca cag atg tgg caa cta gaa gct gct tca aga gct gca ata gag aac gga  
E A L S Q M W Q L E A A S R A A I E N G  
tcc gaa gaa gga taa  
S E E G -

## Anhang 3

DNA- und Proteinsequenz von *cryIY402A* PHR kloniert und exprimiert in pACycDuet1:

6x N-terminaler His-Tag

Mutation auf DNA-Ebene

Mutation auf Proteinebene

DNA-Sequenz:

atgggcagcagccatcaccatcatcaccacagccaggatccgaattcgtctggttctgtatctggttggttctggtggttagtattgt  
atggtttagaagagatcttagggtgaagataatccagctttagcagcagcagtaagagctggtccagtattgctctgtttgttgggcac  
cagaagaagaaggacactatcatccaggtagggttctaggtggtggctcaagaacagtttggtcagcttgattcttctcttagaagtctt  
ggtacttgccttatcaccaagagatctactgatagtgttgcttcttcttgatgttgtaaactccactggtgcttctcagatcttctcaaccattt  
gtatgatccattgtctttggtgcgtgatccaggagctaaagatgtttgacggcgcaaggcatagcggtcgatcattcaacgcagacttg  
ctttatgagccatgggaagtgactgatgaattaggccgtcttctctatgtttgctgcgtttgggagagatgtcttagtatgccttatgacc  
ctgagtctcttcttccacctaagaagatcattcaggggatgtgtctaaatgtgtgcggatccattggtgttgaggatgactctgaga  
aaggaagcaatgcacttctggctcgtgcttggtctcctggatggagtaatggtgataaagcttcacaacgtttataaacgggccattgtt  
gaactactaagaaccgcagaaaagccgatagtgtacaacctcgtttcttctccacacttgcattttggggaagtgagtgtgagaaaag  
ttttcatcttgttcggatcaaacaggtcgcgtgggcaaacgaaggaaacgaggccggggaagaaagcgtgaatctttctgaaatcta  
ttggtctcaggagattcttaggtacataagtttaaccatccatattcccatgaaagaccacttcttgccatctaaagtcttcccttgggc  
tgtggatgagaactatttcaaggcatggaggcaaggccgactggatatccgttggtcgcgatgccgggatgagagagttagggctact  
ggttggttgcgatgcataagagtagttgttcaagcttcttgttaaagtgttcaattaccatggagatgggggatgaagtatttctgg  
gacacacttcttgatgcggatttagaaagcgtgcttcttggttgcaagcgattaccgggtactctcccgatagccgggagtttgatcgc  
atagataaccctcagtttgaagggtacaagtttgatccaaatggtgaatacgtgaaggcgtggcttctgaactctctagactcccgcag  
actggatacatcatccgtggaacgcacctgagtccgttctcaagctgctggtatcgagcttggatcaaactatcctctaccaattgtagg  
attagacgaagcaaaagcacggcttcatgaagcgtttcacagatgtggcaactagaagctgcttcaagagctgcaatagagaacgga  
tccgaagaaggataa

Aminosäuresequenz:

MGSSHHHHHSQDPNSSGSVSGCGSGGCSIVWFRRDLRVEDNPALAAVRAGPVIA  
 LFVWAPEEEGHYHPGRVSRWWLKNSLAQLDSSLRSLGTCLITKRSTDSVASLLDVVK  
 STGASQIFFNHLVDPLSLVRDHRAKDVLTAQGIAVRSFNADLLYEPWEVTDELGRPFS  
 MFAAFWERCLSMFYDPESPLLPPKKIISGDVSKCVADPLVFEDDSEKGSNALLARAW  
 SPGWSNGDKALTTFINGPLLEYSKNRRKADSATTSFLSPHLHFGEVSVRKVFHLVRIK  
 QVAWANEGNEAGEESVNLFLKSIGLREYSRYISFNHPYSHERPLLGHLLKFFPWAVDE  
 NYFKAWRQGRTGYPLVDAGMRELWATGWLHDIRVWVSSFFVKVLQLPWRWGMK  
 YFWDTLDDADLES DALGWQAITGTLPDSREFDRIDNPQFEGYKFDPNGEYVRRWLPE  
 LSRLPTDWIHPWNAPESVLQAAGIELGSNYPLPIVGLDEAKARLHEALSQMWQLEA  
 ASRAAIENGSEEG-

Codons mit den entsprechenden Aminosäuren

atg ggc agc agc cat cac cat cat cac cac agc cag gat ccg aat tcg tct ggt tct gta  
 M G S S H H H H H H S Q D P N S S G S V  
 tct ggt tgt ggt tct ggt ggt tgt agt att gta tgg ttt aga aga gat ctt agg gtt gaa  
 S G C G S G G C S I V W F R R D L R V E  
 gat aat cca gct tta gca gca gca gta aga gct ggt cca gtg att gct ctg ttt gtt tgg  
 D N P A L A A A V R A G P V I A L F V W  
 gca cca gaa gaa gaa gga cac tat cat cca ggt agg gtt tct agg tgg tgg ctc aag aac  
 A P E E E G H Y H P G R V S R W W L K N  
 agt ttg gct cag ctt gat tct tct ctt aga agt ctt ggt act tgt ctt atc acc aag aga  
 S L A Q L D S S L R S L G T C L I T K R  
 tct act gat agt gtt gct tct ctt ctt gat gtt gtt aaa tcc act ggt gct tct cag atc  
 S T D S V A S L L D V V K S T G A S Q I  
 ttc ttc aac cat ttg tat gat cca ttg tct ttg gtg cgt gat cac cga gct aaa gat gtt  
 F F N H L Y D P L S L V R D H R A K D V  
 ttg acg gcg caa ggc ata gcg gtt cga tca ttc aac gca gac ttg ctt tat gag cca tgg  
 L T A Q G I A V R S F N A D L L Y E P W  
 gaa gtg act gat gaa tta ggc cgt cct ttc tct atg ttt gct gcg ttt tgg gag aga tgt  
 E V T D E L G R P F S M F A A F W E R C  
 ctt agt atg cct tat gac cct gag tct cct ctt ctt cca cct aag aag atc att tca ggg  
 L S M P Y D P E S P L L P P K K I I S G

gat gtg tct aaa tgt gtt gcg gat cca ttg gtg ttt gag gat gac tct gag aaa gga agc  
D V S K C V A D P L V F E D D S E K G S  
aat gca ctt ctg gct cgt gct tgg tct cct gga tgg agt aat ggt gat aaa gct ctc aca  
N A L L A R A W S P G W S N G D K A L T  
acg ttt ata aac ggt cca ttg ctt gaa tac tct aag aac cgc aga aaa gcc gat agt gct  
T F I N G P L L E Y S K N R R K A D S A  
aca acc tcg ttt ctt tct cca cac ttg cat ttt ggg gaa gtg agt gtg aga aaa gtt ttt  
T T S F L S P H L H F G E V S V R K V F  
cat ctt gtt cgg atc aaa cag gtc gcg tgg gca aac gaa gga aac gag gcc ggg gaa gaa  
H L V R I K Q V A W A N E G N E A G E E  
agc gtg aat ctt ttc ctg aaa tct att ggt ctc agg gag tat tct agg tac ata agt ttt  
S V N L F L K S I G L R E Y S R Y I S F  
aac cat cca tat tcc cat gaa aga cca ctt ctt ggc cat cta aag ttc ttc cct tgg gct  
N H P Y S H E R P L L G H L K F F P W A  
gtg gat gag aac tat ttc aag gca tgg agg caa ggc cgg act gga tat ccg ttg gtc gat  
V D E N Y F K A W R Q G R T G Y P L V D  
gcc ggg atg aga gag tta tgg gct act ggt tgg ttg cat gat cgc ata aga gta gtt gtt  
A G M R E L W A T G W L H D R I R V V V  
tca agc ttc ttt gtt aaa gtg ctt caa tta cca tgg aga tgg ggg atg aag tat ttc tgg  
S S F F V K V L Q L P W R W G M K Y F W  
gac aca ctt ctt gat gcg gat tta gaa agc gat gct ctt ggt tgg caa **gcg** att acc ggt  
D T L L D A D L E S D A L G W Q **A** I T G  
act ctc ccg gat agc cgg gag ttt gat cgc ata gat aac cct cag ttt gaa ggg tac aag  
T L P D S R E F D R I D N P Q F E G Y K  
ttt gat cca aat ggt gaa tac gta agg cga tgg ctt cct gaa ctc tct aga ctc ccg aca  
F D P N G E Y V R R W L P E L S R L P T  
gac tgg ata cat cat ccg tgg aac gca cct gag tcc gtt ctt caa gct gct ggt atc gag  
D W I H H P W N A P E S V L Q A A G I E  
ctt gga tca aac tat cct cta cca att gta gga tta gac gaa gca aaa gca cgg ctt cat  
L G S N Y P L P I V G L D E A K A R L H  
gaa gcg ctt tca cag atg tgg caa cta gaa gct gct tca aga gct gca ata gag aac gga  
E A L S Q M W Q L E A A S R A A I E N G  
tcc gaa gaa gga taa  
S E E G -

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Einfluss von Nukleotiden auf die biologische Aktivität von Cryptochrom 1 aus *Arabidopsis thaliana*“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, \_\_\_\_\_